



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICO-CIRÚRGICAS

GERMANA GREICY DE VASCONCELOS

ESTUDOS DOS MECANISMOS DE AÇÃO DE 2
DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS OBTIDOS DA *Moringa Oleifera* EM ENSAIO
PRÉ-CLÍNICOS DE DOR NA ATM DE RATOS

Fortaleza-Ce

2019

GERMANA GREICY DE VASCONCELOS

**ESTUDOS DOS MECANISMOS DE AÇÃO DE 2
DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS OBTIDOS DA *Moringa Oleifera* EM ENSAIO
PRÉ-CLINICOS DE DOR NA ATM DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Cirurgia. Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Maria Elisabete Amaral de Moraes

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a. Hellíada Vasconcelos Chaves.

Fortaleza- Ce

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos
pelo(a) autor(a)

V45eVasconcelos, Germana Greicy de Vasconcelos.

Estudos dos mecanismos de ação de 2 derivados semissintéticos (MC-D7 e MC-D9) obtidos da Moringa oleifera em ensaio pré-clínicos de dor na ATM de ratos / Germana Greicy de Vasconcelos Vasconcelos. – 2019.

56 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de PósGraduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes .
Coorientação: Profa. Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves.

1. Moringa oleifera. 2. articulação temporomandibular . 3. nocicepção. 4. receptores opioides. I. Título.

CDD 617

GERMANA GREICY DE VASCONCELOS

**ESTUDOS DOS MECANISMOS DE AÇÃO DE 2
DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS (MC-D7 E MC-D9) OBTIDOS DA *Moringa
Oleifera* EM ENSAIO PRÉ-CLINICOS DE DOR NA ATM DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Cirurgia. Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Maria Elisabete Amaral de Moraes

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a. Hellíada Vasconcelos Chaves.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a. Maria Elisabete Amaral de Moraes (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a Kadidja Cláudia Maia e Machado (Examinadora)

UNIFAMETRO

Prof. Dr. Jair Mafezoli (Examinador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AADR	Association of Dental Research
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
Amino	Aminoguanidina
AMPA	Receptor AMPA
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de Variância
ATM	Articulação temporomandibular
ATP	Adenosina trifosfato
BVD	Biliverdina
CB1	receptor canabinoide 1
CO	Dióxido de carbono
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DTM	Disfunção temporomandibular
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EM 2	Endomorfina 2
± EPM	Mais ou menos o erro padrão da média
GABA	ácido γ -aminobutírico
GC	Guanilato ciclase
GT	Gânglio trigeminal
HO-1	Hemo-oxigenase 1
HO-2	Hemo-oxigenase 2
i.a	Intraarticular
IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-8	Interleucina 8
Indo	Indomentacina
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzida
i.p	intraperitoneal
IRI	Isquemia reperfusão renal

ITCs	Isotiocianatos
κ	kappa
K^+ ATP	Bloqueador de canais de potássio
MC-D7	<i>N</i> -[4-(4'- <i>O</i> -acetil- α -L-raminosiloxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida
MC-D9	4- {[4'- <i>O</i> -acetil-2',3'- <i>O</i> -bis(decanoiloxi)- α -L raminosiloxi]benzil} isotiocianato
MMP	Metaloproteinases ns
mg	Miligrama
mg/kg:	Miligrama por quilo
NF- κ	Fator nuclear kappa B
η g	Nanograma
NO	Óxido Nítrico
Nociceptores específicos	
NOS	Óxido nítrico sintaxe
NOS 1	Óxido nítrico sintaxe 1
NOS 2	Óxido nítrico sintaxe 2
NOS 3	Óxido nítrico sintaxe 3
ODQ	Inibidor da guanilato ciclase
OMS	Organização Mundial de Saúde
$P < 0,05$	Probabilidade de erro menor que 5%
PGE2	Prostaglandina E2
PMNs	Polimorfonucleares
PKG	Proteína quinase G
s.c	subcutânea
SC	Subnúcleo caudal
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TENS	Estimulação elétrica transcutânea
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TPA	Tecido periarticular
μ g	micrograma
μ L	Microlitros
US	Ultrassom

V.O	Via oral
WDR	Varição dinâmica ampla
ZnPP-IX	Zinco Protoporfirina IX
δ	delta
μ	mu
\pm EPM	Mais ou menos o erro padrão da média

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Articulação Temporomandibular (ATM)	19
Figura 2 - Mecanismo da dor Orofacial	22
Figura 3 - Mediadores inflamatórios envolvidos na dor inflamatória da ATM	24
Figura 4 – Derivado do MC-1 (MC-D7 e MC-D9)	35
Figura 5 – Delineamento experimental grupo Salina	36
Figura 6 – Seringa de Hamilton	37
Figura 7 – Delineamento experimental grupo Formalina	37
Figura 8 – Delineamento da Via do NO/cGMP/PKG/K ⁺ _{ATP}	38
Figura 9 – Delineamento da via HO-1/ cGMP/ PKG / K ⁺ _{ATP}	39
Figura 10 – Delineamento da Via Opióide	39
Figura 11 - Efeito do MC-D7 e MC-D9 na hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos.	41
Figura 12 - Estudo do envolvimento do NO/cGMP/PKG/K ⁺ _{ATP} na atividade antinociceptiva do MC-D7	42
Figura 13 - Estudo do envolvimento do NO / cGMP / PKG / K ⁺ _{ATP} no efeito antinociceptivo do MC-D9	43
Figura 14 - Estudo do envolvimento da via HO-1/ cGMP/ PKG / K ⁺ _{ATP} na atividade antinociceptiva do MC-D7 na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM esquerda de ratos	44
Figura 15 - Estudo do envolvimento da HO-1/ cGMP / PKG / K ⁺ _{ATP} na atividade antinociceptiva do MC-D9 na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina em ratos.	45
Figura 16 - Estudo do envolvimento da via opioide na atividade antinociceptiva do MC- D7 e MC-D9.	46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Dor Orofacial	18
2.2 Articulação Temporomandibular	18
2.3 Mecanismo da Dor Orofacial	21
2.4 Mediadores Inflamatórios envolvidos na dor inflamatória da ATM	23
2.4.1 Via HO-1/ GMPc/ PKG /K⁺_{ATP}	25
2.4.2 Via NO/GMPc/ PKG /K⁺_{ATP}	27
2.4.3 Opioides	28
2.5 Disfunção Temporomandibular	29
2.6 Moringa oleifera	30
3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	33
4 OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo Geral	34
4.2 Objetivos Específicos	34
5 METODOLOGIA	35
5.1 Obtenção do derivado semissintético MC-D7 e MC-D9	35
5.2 Animais	35
5.3 Eficácia antinociceptiva e anti-inflamatória de MC-D7 e MC-D9 no modelo de hiperalgesia inflamatória induzida na articulação temporomandibular (ATM) de ratos	35
5.3.1 Delineamento experimental	36
5.3.2 Injeções intra-articulares	36
5.3.3 Testes comportamentais para a avaliação da resposta nociceptiva induzida pela formalina	37
5.3.4 Papel da via do NO / GMPc / PKG / K⁺_{ATP} na antinocicepção induzida por MC-D7 e MC-D9	38
5.3.5 Envolvimento da via HO-1/ GMPc / PKG / K⁺_{ATP} na antinocicepção induzida por MC-D7 e MC-D9	38
5.3.6 Estudo da via opioide central na antinocicepção induzida por MC-D7 e MC-D9	38
5.4 Análises estatísticas	40
6 RESULTADOS	41
6.1 Efeito do MC-D7 e MC-D9 na hipernocicepção inflamatória induzida por	

formalina na ATM de ratos	41
6.2 Envolvimento do NO/GMPc/ PKG/ K⁺ ATP na atividade antinociceptiva do MC-D7 na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM esquerda de ratos	41
6.3 Envolvimento do NO/ GMPc/ PKG/ K⁺ ATP na atividade antinociceptiva do MC-D9 na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM esquerda de ratos	42
6.4 Envolvimento da via HO-1/ GMPc/ PKG/ K⁺ ATP na atividade antinociceptiva do MC-D7 na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM esquerda de ratos.	43
6.5 Envolvimento da via HO-1/ GMPc/ PKG/ K⁺ ATP na atividade antinociceptiva do MC-D9 na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM esquerda de ratos.	45
6.6 Envolvimento da via opioide na atividade antinociceptiva do MC-D7 e MC-D9 na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM esquerda de ratos	46
7 DISCUSSÃO	47
8 CONCLUSÃO	50
REFERENCIAS	51

RESUMO

Introdução: As disfunções temporomandibulares (DTMs), que representam a segunda causa de dor orofacial na prática clínica, compreendem um grupo heterogêneo de desordens musculoesqueléticas que envolvem a articulação temporomandibular (ATM). Os fármacos mais utilizados são os AINES, porém a evidência da eficácia destas drogas no tratamento da DTM é muito limitada, e o seu uso continuado pode causar uma série de efeitos colaterais indesejáveis. Nas últimas décadas tem crescido o interesse na bioprospecção de substâncias derivadas de plantas nativas. *Moringa oleifera* adapta-se especialmente bem ao clima semiárido da região Nordeste do Brasil. Estudos têm demonstrado a capacidade dos isotiocianatos (ITCs) derivados da *M. oleifera* em inibir o processo inflamatório. No grupo de pesquisa desenvolveu 3 compostos semisintéticos, que gerou o depósito de 3 patentes, obtidos a partir de um composto extraído das flores da *M. oleifera*. Ainda, estudo demonstrou que esses compostos não apresentam toxicidade sistêmica e mostraram propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória. **Objetivo:** Avaliar o mecanismo de ação antinociceptivo e anti-inflamatório de dois compostos semissintéticos MC-D7 e MC-D9 obtidos a partir do isotiocianato MC-1 isolado das flores de *M. oleifera* na ATM de ratos. **Materiais e Métodos:** Foram utilizados ratos Wister machos (peso de 180-240g), tratados por via oral com solução salina, MC-D7 (1 µg/kg) e MC-D9 (1 ng/kg). Após 60 min. foi aplicada injeção intra-articular de solução salina (50 µL, 0,9%) no grupo controle ou formalina (50 µL, 1,5%) na ATM esquerda. A resposta nociceptiva foi avaliada pela quantidade de vezes (em seg.) do ato de coçar a região da ATM esquerda e as vezes que ergueu a cabeça de forma reflexiva no período de 45 min. Ademais, foi testado o papel dos receptores opioides centrais, da enzima hemioxigenase-1 (HO-1) e da via NO/GMPc/PKG/K⁺ATP no mecanismo de ação antinociceptiva de MC-D7 e MC-D9. O comportamento nociceptivo foi avaliado por 45 min. Para investigar a participação de HO-1/GMPc/PKG/K⁺ATP e da via NO/GMPc/PKG/K⁺ATP, utilizaram-se os inibidores ZnPP-IX, aminoguanidina, ODQ, KT5823 e glibenclamida, 30 min antes da administração de MC-D7 (1 µg/kg) ou MC-D9 (1 ng/kg), respectivamente. Para estudar os receptores opioides, ratos foram pré-tratados (15 min) com injeção intratecal do inibidor não seletivo naloxona do receptor opioides µ. **Resultados e Discussão:** O tratamento com MC-D7 1 µg/kg e MC-D9 1 ng/kg diminuíram significativamente o resultado comportamental nociceptivo quando comparado ao grupo formalina. O inibidor de iNOS aminoguanidina, ODQ e glibenclamida revertem o efeito antinociceptivo de MC-D9, porém KT 5823 não reverteu efeito antinociceptivo da MC-D9 na hipernocicepção da ATM induzida pela formalina. O inibidor específico da HO-1 (ZnPP-IX) reverteu o efeito antinociceptivo do MC-D7 na hipernocicepção da ATM induzida por formalina, quando comparado ao grupo MC-D7; ODQ reverteu o efeito MC-D7, quando comparado ao grupo MC-D7 sozinho; KT5823 e a glibenclamida não revertem o efeito antinociceptivo do MC-D7 na hipernocicepção da ATM induzida pela formalina. O antagonista não-seletivo dos receptores opioides naloxona não reverteu o efeito do MC-D7 e MC-D9 de forma estatisticamente significativa, quando comparado aos grupos MC-D7 e MC-D9, respectivamente. O inibidor seletivo da hemoxigenase-1 (HO-1) ZnPP-IX não reverteu o efeito antinociceptivo do MC-D9 quando comparado com o grupo MC-D9. **Conclusão:** Os mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo de MC-D7 age periféricamente pela via HO-1/GMPc e MC-D9 age também periféricamente pela via óxido nítrico NO/GMPc/K⁺ATP.

Palavras Chave: *Moringa oleifera*; articulação temporomandibular; nocicepção; receptores opioides.

ABSTRACT

Introduction: Temporomandibular disorders (TMDs), which represent the second cause of orofacial pain in clinical practice, comprise a heterogeneous group of musculoskeletal disorders involving the temporomandibular joint (TMJ). The most commonly used drugs are NSAIDs, but evidence of their efficacy in treating TMD is very limited, and their continued use can cause a number of undesirable side effects. Interest in the bioprospecting of substances derived from native plants has increased in recent decades. *Moringa oleifera* adapts especially well to the semiarid climate of northeastern Brazil. Studies have shown the ability of *M. oleifera*-derived isothiocyanates (ITCs) to inhibit the inflammatory process. In the research group developed 3 semisynthetic compounds, which generated the deposit of 3 patents, obtained from a compound extracted from the flowers of *M. oleifera*. Also, a study showed that these compounds do not present systemic toxicity and showed antinociceptive and anti-inflammatory properties. **Objective:** To evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory mechanism of action of two semisynthetic compounds MC-D7 and MC-D9 obtained from MC-1 isothiocyanate isolated from *M. oleifera* flowers in the rat TMJ. **Materials and Methods:** Male Wistar rats (weight 180-240g), orally treated with saline, MC-D7 (1 µg / kg) and MC-D9 (1 ng / kg) were used. After 60 min Intra-articular saline injection (50 µL, 0.9%) was applied to the control or formalin group (50 µL, 1.5%) in the left TMJ. Nociceptive response was assessed by the number of times (in seconds) of scratching the left TMJ region and the times that the head was reflexively raised within 45 min. In addition, the role of central opioid receptors, hemoxygenase-1 (HO-1) and NO / GMPc / PKG / K + ATP pathway in the antinociceptive mechanism of action of MC-D7 and MC-D9 was tested. Nociceptive behavior was evaluated for 45 min. To investigate the participation of HO-1 / GMPc / PKG / K + ATP and the NO / GMPc / PKG / K + ATP pathway, inhibitors ZnPP-IX, aminoguanidine, ODQ, KT5823 and glibenclamide were used 30 min before administration of MC-D7 (1 µg / kg) or MC-D9 (1 ng / kg), respectively. To study opioid receptors, rats were pretreated (15 min) with intrathecal injection of naloxone opioid receptor inhibitor µ. **Results and Discussion:** Treatment with MC-D7 1 µg / kg and MC-D9 1 ng / kg significantly decreased nociceptive behavioral outcome when compared to formalin group. The iNOS inhibitor aminoguanidine, ODQ and glibenclamide reversed the antinociceptive effect of MC-D9, but KT 5823 did not reverse the antinociceptive effect of MC-D9 on formalin-induced TMJ hypernociception. The HO-1 specific inhibitor (ZnPP-IX) reversed the antinociceptive effect of MC-D7 on formalin-induced TMJ hypernociception when compared to the MC-D7 group; ODQ reversed the MC-D7 effect when compared to the MC-D7 group alone; KT5823 and glibenclamide did not reverse the antinociceptive effect of MC-D7 on formalin-induced TMJ hypernociception. The non-selective opioid receptor antagonist naloxone did not reverse the effect of MC-D7 and MC-D9 statistically significantly when compared to MC-D7 and MC-D9, respectively. The selective hemoxygenase-1 (HO-1) inhibitor ZnPP-IX did not reverse the antinociceptive effect of MC-D9 when compared to the MC-D9 group. **Conclusion:** The mechanisms involved in the antinociceptive effect of MC-D7 act peripherally via the HO-1 / cGMP pathway and MC-D9 also act peripherally via the NO / GMPc / K + ATP pathway.

Keywords: *Moringa oleifera*; ear-jaw articulation; nociception; opioid receptors

Aos meus filhos Maria Isadora e Agamenom Neto, grandes incentivadores do todo meu esforço e dedicação. Luz da minha Vida!!!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que me guiou, iluminou e tornou possível a realização desse sonho mesmo diante às dificuldades do dia-a-dia.

Ao meu esposo Manoel Mendes Júnior que sempre esteve ao lado me apoiando nessa difícil jornada.

À minha Orientadora Prof^ª Dr^ª. Maria Elisabete Amaral de Moraes por ter me ajudado desde no início ainda na construção do projeto e confiar no meu potencial.

À minha Co-orientadora Prof^ª Dr^ª Hellíada Vasconcelos Chaves, pelos ensinamentos valiosos, pelas exigências, por acreditar na minha capacidade e por sempre mostrar que apesar das adversidades podemos realizar grandes desafios.

À Prof^ª Mirna Marques Bezerra, por todo conhecimento repassado, por sempre estar disponível, por ser nossa porta-voz em Fortaleza.

À prof^ª Maria Sônia Felício Magalhães por todo apoio, receptividade em sua residência quando ia para aulas em Fortaleza e pela enorme ajuda nas correções no projeto no início da seleção mestrado. Todos seus conhecimentos foram valiosos para meu engrandecimento acadêmico e profissional.

Ao meu grande amigo e parceiro de todas as horas José Henrique Linhares que há tempos me incentivava a fazer a seleção do mestrado, além da sua proatividade e contribuição científica na minha jornada profissional.

A minha amiga e companheira de todas disciplinas do mestrado Ana Eugênia Linhares.

A minha grande amiga e aluna Mestrado em Biotecnologia Éster Frota, que sempre esteve disponível para me ajudar, inclusive sábado, domingo e feriados e sempre esteve de prontidão para descobrir soluções para o desenvolvimento desse projeto.

A todos os ICS do LAFS, Ariely, Andressa, Tiago, Manoel, Pedro Wherton, Pedro Ivo, Pedro Fontenele, Sarah que se dedicaram, empenharam aos sábados, domingos e feriados para me acompanhar na execução da coleta dos meus resultados.

À Nayara, que foi uma parceira, me ajudando incontáveis vezes nas diluições de drogas, nas dosagens e contribuiu com seus conhecimentos ao longo dessa caminhada.

Ao meu amado pai Antônio Agamenom Araújo Vasconcelos (in memoriam) que sempre intercedeu por mim lá de cima.

A minha mãe Francisca Adília de Vasconcelos por sempre estar prontamente a me servir e ajudar a qualquer dia e hora, aos meus irmãos Gerlena Vasconcelos e Antônio Osmundo Vasconcelos Neto por acreditarem na minha capacidade e por todo incentivo dado; a minha

cunhada Lya Mara por toda ajuda e apoio nos momentos difíceis.

A toda minha família pelo amor, carinho e apoio

À minha secretária Dayane de Pinho Veras por cuidar e acompanhar tão bem o crescimento e educação dos meus filhos durante as minhas ausências.

Ao Felipe e Alfredo que me recepcionaram tão bem no laboratório e ainda me ajudaram com todo conhecimento possível nos primeiros experimentos.

Às minhas amigas da pós: Estér, Larissa, Jordânia, Samila, Timóteo que além de contribuir com seus conhecimentos ainda tornaram meus dias mais alegres.

À Alana (veterinária da UFC e membro do comitê de ética) pela sua simpatia e por suas dicas valiosas na elaboração do projeto.

A todos os funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Aos colegas da turma de mestrado, pelos momentos de reflexão e sugestões recebidas.

Aos funcionários do biotério, sempre solícitos.

Aos animais que deram sua vida para que essa pesquisa pudesse ser realizada.

À CAPES, ao CNPQ e à FUNCAP pelo suporte financeiro.

1 INTRODUÇÃO

A dor é reconhecida como uma alteração biopsicossocial de difícil entendimento, pois engloba as diversas dimensões humanas, dificultando sua medição. A dor é uma experiência emocional e sensorial desagradável, associada a um dano tissular real ou potencial ou descrita em termos de tal dano. A sensação de dor sempre se fez presente na história da humanidade, em que a dor não estabelece posição isolada ou direta da quantidade de dano tecidual, mas é o resultado da relação entre várias funções (ALMEIDA, COSTA JUNIOR, DOCA, & TURRA, 2010). O quadro álgico é uma situação muito subjetiva, na qual sua mensuração vai necessitar da descrição de quem a sente. Por se tratar de uma existência, a noção da dor é caracterizada como uma experiência multidimensional, em que a peculiaridade e a intensidade sensorial são alteradas por inúmeras variáveis afetivas e emocionais (SANTOS; GIACOMIN; FIRMO, 2015).

A dor está inserida como um dos principais motivos para a procura dos serviços de saúde da população de maneira geral, apresentando aproximadamente 25% a 50% das consultas dos serviços de saúde primários, em que a dor crônica representa cerca de 20% da procura dessas consultas. A dor atinge em torno de 30-40% de indivíduos em algum momento da sua vida, e entre alguns deles essa durabilidade poderá ser superior quando comparadas a outros indivíduos. A dor pode ser do tipo nociceptiva (classificada em visceral ou somática) ou não-nociceptiva. A dor do tipo nociceptivo se manifesta através de estímulos específicos nos receptores da dor (MOFFAT, 2011).

A função primordial da dor no organismo é atuar como um sinal de alerta, desencadeando reações de defesa e proteção, de maneira a diminuir o dano tecidual. A Agência Americana de Saúde Pública e a Sociedade Americana de Dor considera a dor como o 5º sinal vital a ser registrado como norma de boa prática, e sua existência e intensidade sejam reconhecidas, avaliadas, diagnosticadas e registadas como prioridade no campo de assistência aos cuidados à saúde na perspectiva de uma terapêutica ideal (NASCIMENTO; KRELING, 2001).

A dor inflamatória está normalmente relacionada a uma alteração da sensibilidade dolorosa, de maneira que a região inflamada se torne fonte de dor notável. Percebe-se que na região inflamada ocorre uma diminuição do limiar de dor a estímulos térmicos, mecânicos ou químicos, proveniente de uma sensibilização dos nociceptores, situação essa nomeada de hiperalgesia, ou seja, uma resposta aumentada a um estímulo que é comumente doloroso (RIEDEL E NEECK, 2001). Scarpelli (2007) relata que a dor aguda acontece em virtude da nocicepção, sendo

normalmente um sinal biológico agregado a uma alteração reconhecida, que pode ser minimizado com recurso terapêutico.

A dor, aguda ou crônica, representa a principal razão pelo qual uma pessoa procura tratamento médico ou odontológico. Enquanto a dor aguda é um sintoma que alerta o paciente sobre a possível existência de uma lesão no seu organismo, a dor crônica não apresenta esse valor biológico, levando à incapacidade significativa na vida dos pacientes (BRANCO *et al.*, 2005).

A dor orofacial é uma sensação dolorosa que pode incluir as estruturas moles e mineralizados da cabeça, face, pescoço e tecidos associados. Os sinais e sintomas podem aparecer por intermédio de algias dentárias, na forma de dores gengivais, úlceras, traumas, tumores, cefaleias, algias nos músculos da face e/ou na articulação mandibular. A dor orofacial de origem musculoesquelética, não dentária, tem apresentado prevalência importante. Entre os processos dolorosos que afetam a região orofacial, a disfunção temporomandibular (DTM) é a segunda maior causa nas clínicas, seguida pelas dores odontogênicas (FERNANDES *et al.*, 2007)

O tratamento para paciente com DTM está ligado ao alívio da dor e restabelecimento da função através de tratamento medicamentoso (anti-inflamatórios e analgésicos), aconselhamento, terapia psicológica, placas inter-occlusias (no caso de pacientes que apresentam bruxismo do sono), agulhamento seco, viscosuplementação da ATM, procedimentos cirúrgicos, acupuntura e fisioterapia (cinesioterapia, reeducação postural global- RPG, crioterapia, termoterapia, laserterapia, estimulação elétrica transcutânea – TENS, ultrassom (US) (TORRES *et al.*, 2012). Essas terapias têm apresentado bons resultados, porém o controle do processo doloroso ainda necessita ser melhor estudado e detalhado, assim intervenções terapêuticas, visto que os medicamentos atualmente existentes levam a importantes efeitos adversos.

Produtos naturais para fins medicinais são conhecidos há milhões de anos e são apresentados como importante ação farmacêutica para prevenir e curar várias patologias e enfermidades. De acordo com Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que em torno de 80% da população mundial que tem dificuldade ao acesso ao serviço primário de saúde, recorre especialmente a plantas medicinais (NEWMAN *et al.*, 2000). Nos dias atuais, aproximadamente 25% de todos os fármacos prescritos pelo mundo são derivados de plantas medicinais. Das substâncias conhecidas e consideradas como primordiais e fundamentais pela OMS, 11% são oriundos unicamente de plantas, e um número relevante são medicamentos sintéticos originados a partir de precursores naturais (RATES, 2001).

Nesse cenário se enquadra a planta *Moringa oleifera*, que é consumida em regiões tropicais e subtropicais por suas valiosas características nutricionais e medicinais, sendo utilizada para

gerenciamento de diversas patologias, entre elas cardíacas, oculares, processos inflamatórios e dispepsia. A planta apresenta bom crescimento, mesmo em períodos de grande estiagem. No Brasil, a *M. oleifera* é encontrada na região Nordeste, especialmente nos Estados do Maranhão, Piauí e Ceará, onde foi implantada por volta de 1950 (AGUIAR, 2010).

Estudos farmacológicos têm demonstrado que *Moringa oleifera* apresenta ação antioxidante, antitumoral, antiinflamatório, propriedades antiespasmódicas e antidiuréticas, que podem estar relacionadas à presença de metabólitos vegetais presentes na planta, como as vitaminas, minerais, aminoácidos, glicosídeos, carotenoides, flavonoides e fenólicos (BAKRE; ADERIBIGBE; ADEMOWO, 2013).

No estudo de Alhakmani; Kumar; Khan (2013) foi descrita ação antiinflamatória das flores da *Moringa oleifera*, por apresentar no composto da flor abundantes ácidos fenólicos e flavonoides, além da importante ação antioxidante *in vitro* e *in vivo*, por isso a indicação de ser utilizada na prevenção da evolução de muitas doenças. Conforme descreve Anwar *et al.* (2007), dentre os usos medicinais da flor, destacam-se outras ações como estimulante, afrodisíaca, abortiva, antiinflamatória, antitumoral, etc. Na pesquisa realizada por Mishra *et al.* (2011), foi realizada uma investigação fitoquímica das diferentes partes da planta, onde se confirmou ação antiinflamatória e analgésica do extrato da flor da *Moringa oleifera*, por apresentar em seu extrato rica fonte de glicosídeos, fenóis, esteróis, flavanois presentes na planta.

Quase todas as partes da planta são utilizadas para diferentes doenças na medicina Indiana e no sul da Ásia, incluindo o tratamento da diabetes, hipertensão, doenças inflamatórias e infecciosas. Tanto as folhas como flores, raízes, gomas e frutas são extensamente utilizados para o tratamento inflamatório (VERMA; VIJAYKUMAR; MATHELA, 2009).

Nesse contexto, em parceria com o Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará, foi isolado o composto 4-(4'-O-acetil- α -L-raminosiloxi) benzilisotiocianato (MC-1) de flores de *M. oleifera*, a partir do qual foram obtidas 3 moléculas semissintéticas, a saber: 4-[(2',3',4'-O-triacetil- α -L-raminosiloxi) N-benzil hidrazinacarbotioamida (MC-H); N-[4-(4'-O-acetil- α -L-raminosiloxi) benzil] -2- (piridinil4-carbonil) hidrazina-1-carbotioamida (MC-D7) e 4-[4'-O-acetil-2',3'-O-bis (decanoiloxi) α -L-raminosiloxi] benzilisotiocianato (MC-D9) cujo estudo por nosso grupo de pesquisa resultou no depósito das patentes sob números BR 102016030476, BR 102016030480 e BR 102016030484, respectivamente. Os estudos de Santos *et al.* (2018), Silveira (2017) e Parente (2017) relatam ação antiinflamatória e analgésica desses compostos semissintéticos obtidos do extrato da flor de *Moringa oleifera* na ATM de ratos, já demonstrando, inclusive, que esses 3 compostos não apresentam toxicidade. Diante disso a importância de

continuar-se o estudo dos mecanismos de ação desses compostos MC-D7 e MC-D9 na dor inflamatória da ATM.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Dor Orofacial

A dor orofacial é definida como toda dor relacionada a estruturas moles e/ou mineralizados (pele, vasos sanguíneos, ossos, dentes, glândulas ou músculos) do componente oral e/ou facial. Essa dor pode ser manifestada na região da cabeça e/ou pescoço ou ainda podendo mesmo estar associada a outras condições sistêmicas como cefaleias primárias, cervicalgias e doenças reumáticas como fibromialgia e artrite reumatoide (CARRARA; CONTI; BARBOSA, 2010). Estudos epidemiológicos têm mostrado que a dor orofacial apresenta alta prevalência, e que apresenta efeitos indesejáveis na qualidade de vida da população (HARGREAVES, 2011; ZAKRZEWSKA, 2013). Uma pesquisa realizada no Brasil com numa população de adultos e idosos demonstrou que a prevalência da dor orofacial e da cefaleia foi de 55,5%, estando relacionada a comorbididades, ao uso indiscriminado de medicamentos e ao prejuízo na qualidade de vida (DE SIQUEIRA; VILELA; FLORINDO, 2015).

Conforme Kuroiwa *et al.* (2011), dependendo do grau, a dor orofacial poderá acarretar alterações significativas na qualidade de vida dos pacientes quando comparada a outras condições sistêmicas como diabetes, hipertensão ou úlcera. Pessoas nessa condição passam por grandes mudanças no seu cotidiano, envolvendo ausência no ambiente de trabalho, distanciamento dos amigos e familiares, insatisfação com a condição bucal, consumo de fármacos e mudança nos hábitos alimentares.

A Academia Americana de Dor Orofacial retrata que a desordem temporomandibular engloba vários sinais e sintomas que incluem ruídos nas articulações temporomandibulares, como estalidos e/ou crepitação; dores nos músculos da mastigação; dificuldade nos movimentos mandibulares; algias na região da face; cefaleias e dores na articulação temporomandibular (ATM) (BOCCHI; KUHN; NASCIMENTO, 2000).

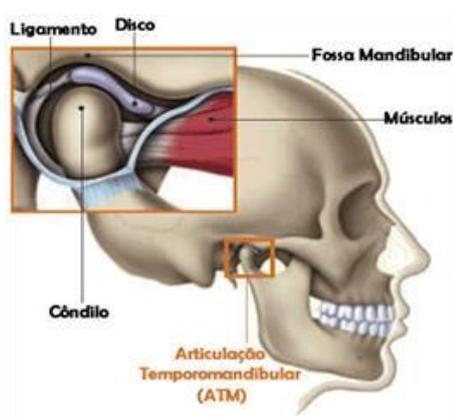
2.2 Articulação Temporomandibular (ATM)

A articulação temporomandibular é uma articulação sinovial que pertence ao sistema estomatognático, podendo realizar uma diversidade de movimentos. Está presente nos dois lados

da face, à frente do ouvido e se fixa aos ossos temporais do crânio através de ligamentos. A estabilidade e função da articulação são importantes para mastigação, deglutição, fonação e ainda pela postura da mandíbula (MENEZES; BUSSADORI; FERNANDES e BIASOTTO-GONZALEZ, 2008). Para Ramos *et al.* (2004), a ATM é identificada como uma das mais complexas articulações do corpo humano, pois tem possibilidade de realizar movimentos rotacionais e translacionais, em virtude do par de articulações. A ATM pode ser acometida pelas mesmas patologias e disfunções que afetam outras articulações do sistema músculo-esquelético, entre eles destacamos os distúrbios articulares, degenerativos, deslocamento de disco, artrites inflamatórias.

São estruturas constituintes da ATM: cabeça da mandíbula e parte escamosa do osso temporal, cartilagem articular, membrana sinovial, disco articular, ligamento temporomandibular e ligamentos acessórios (Figura 1). Como as faces articulares da ATM são irregulares, é indispensável que o disco articular se posicione entre elas para que se consiga realizar movimento suave da mandíbula. Considerado um dos ossos mais complexos do nosso esqueleto, o osso temporal se articula com a parte anterior e lateral do occipital. Este osso situa-se na porção inferior e externa do crânio, podendo dividir-se em quatro porções: porção escamosa, mastoidea, porção timpânica e petrosa. Estas três superfícies ósseas, fossa mandibular, eminência articular e cabeça da mandíbula, compreendem a estrutura óssea da articulação temporomandibular (ATM), que é responsável pelos movimentos mandibulares juntamente com os músculos mastigatórios (SANTOS *et al.*, 2009).

Figura 1. Articulação Temporomandibular (ATM)



Fonte: Adaptado de OKESON, 2003

O disco articular é uma estrutura fibrocartilaginosa que se localiza acima da cabeça da mandíbula, recobrimo-a. Divide-se em três porções: anterior, medial e posterior. A região anterior,

com aproximadamente 2 mm de espessura é composta por tecido conjuntivo denso com fibras de colágenos tipo I e II, compactadas e entrelaçadas fortemente em diferentes sentidos. Na região anterior, o disco, além de se fundir com a cápsula articular, também mantém ligação com fibras da cabeça superior do músculo pterigoide lateral (RIZZOLO; MADEIRA, 2006). Na região posterior, a união entre o disco e a cápsula é interligada pelo coxim retrodiscal, uma zona bilaminar de camadas vascularizadas e inervadas, compostas de tecido conjuntivo frouxo, com fibras elásticas e fibras colágenas (OLIVEIRA, 2002). A região central do disco é mais delicada do que a porção anterior e posterior, sendo capaz de ser comparada com uma lente bicôncava. (RIZZOLO; MADEIRA, 2006). Não se fixa em nenhuma região do temporal, mas se insere estreitamente na cabeça da mandíbula através de ligamentos medial e lateral. A inserção desses ligamentos concebe que o disco conduza a cabeça da mandíbula no decorrer do movimento de translação, e também possibilita movimentos de rotação sem que o disco se movimente (OLIVEIRA, 2002).

O meio de ligação da ATM acontece através da cápsula articular com os ligamentos. A cápsula articular é composta por uma membrana fibrosa, ricamente vascularizada se estendendo até a periferia do disco articular. Esta última inserção divide a cavidade em dois compartimentos: o superior e o inferior. Cada um dispõe de uma membrana sinovial própria que recobre a região interna correspondente da cápsula (SANTOS *et al.*, 2009). A cápsula articular é composta por dois tipos de fibras: as longas, sendo elas superficiais e espessas, e as fibras curtas, sendo elas mais profundas. A cápsula articular é delgada em quase toda a sua extensão, especialmente na parte anterior onde se insere o músculo pterigoideo lateral com o disco (NUNES; MACIEL & BABINSK, 2005).

A membrana sinovial recobre a cápsula articular internamente nos compartimentos supradiscal e infradiscal, e estende-se embaixo e acima do coxim ou zona retrodiscal. Tem por missão de produzir o líquido sinovial (SANTOS *et al.*, 2009). O líquido sinovial, produzido pela membrana sinovial, é viscoso, nutritivo e poderoso lubrificante das articulações, diminuindo o desgaste, e é também encarregado pela nutrição das estruturas não vascularizadas (OLIVEIRA, 2002).

O ligamento temporomandibular é único ligamento verdadeiro da ATM. Na região superior se insere no processo zigomático do temporal e na eminência articular até a vizinhança do processo retroarticular. Suas fibras convergem para trás e para cima para se inserir abaixo do colo da mandíbula em uma estrutura pequena logo abaixo da inserção do disco articular, gerando um triângulo e deixando exposta uma discreta área da cápsula (RIZZOLO; MADEIRA, 2006). Possui fibras oblíquas superficiais e profundas. As fibras oblíquas atuam como estabilizadoras no

movimento de translação, e as fibras profundas limitam os movimentos retrusivos da mandíbula a fim de impedir a compressão de estruturas posicionadas na região posterior do côndilo mandibular. Age dessa maneira estabelecendo limite no movimento posterior da cabeça da mandíbula e do disco articular, especialmente em pessoas desprovidas de dentes na região posterior, nos quais carecem intercuspidação de dentes para ancoragem da posição do côndilo. É constituído por tecido conjuntivo colagenoso, não-contrátil, não elástico. Assim trabalha de maneira passiva, não movimentando a ATM como uma atividade muscular faria (RIZZOLO; MADEIRA, 2006).

Há ainda os ligamentos acessórios, que são ligamentos que dão sustentação ligamentosa complementar a ATM. O ligamento esfenomandibular vai desde a espinha do esferoide até línula da mandíbula, e o ligamento estilomandibular se estende do processo estiloide até ângulo da mandíbula. Como estão distantes da ATM, não apresentam influência nos seus movimentos (RIZZOLO; MADEIRA, 2006).

Diante de uma gama de patologias que implica na integridade do sistema estomatognático, destacamos os distúrbios da articulação temporomandibular (DTM) que podem modificar a estabilidade dinâmica das estruturas que englobam esse complexo sistema e, diante disso, acarretará uma sequência de sinais e sintomas específicos (DAMASCENO; BARBIERI, 2014).

2.3 Mecanismo da Dor Orofacial

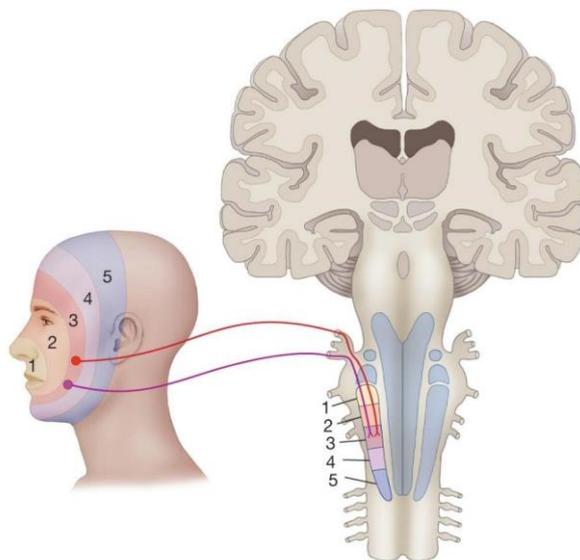
Várias etapas podem ser avaliadas e identificadas no processo dos sinais nocivos neurais que desencadeiam a percepção de dor. A primeira etapa da sequência que dará origem ao processo doloroso é conhecida como transdução, que significa o processo de transformação dos estímulos agressivos (físicos, biológicos ou químicos) em potenciais de ação, que serão transduzidas das fibras nervosas periférica para sistema nervoso central (SNC), principalmente pelo V par de nervos cranianos - nervo trigêmio (TEIXEIRA, 2001), além de outras estruturas nervosas como nervo facial (VII par), nervo glossofaríngeo (IX par), nervo vago (X par) e nervos cervicais superiores (SESSLE, 2000). Na segunda fase, acontece a transmissão, em que a mensagem é propagada através do trato espinal do trigêmio no tronco encefálico para o tálamo. Por último, as conexões entre o tálamo e centros corticais superiores procedem ao controle perceptivo e integram a resposta afetiva à dor (DOURADO, 2007; MOFFAT E RAE, 2010).

Os nociceptores são terminações nervosas livres encarregadas pela propagação da sensibilidade da dor e estão interligados em fibras A-delta (mielinizadas e rápida condução) e fibras C (amielinizadas e lenta condução) (SILVA *et al.*, 2013). Logo após a percepção do impulso

nociceptivo pelos nociceptores, essa mensagem é dirigida ao SNC por meio das fibras aferentes primárias, que possuem os corpos celulares no gânglio trigeminal, situado em uma cavidade na base do crânio. Esses neurônios primários fazem sinapses com neurônios de 2ª ordem no subnúcleo caudal do trato espinal do trigêmeo no complexo trigeminal situado no tronco encefálico (SESSLE, 2005).

O complexo trigeminal do tronco encefálico é subdividido anatômico e funcionalmente em núcleo sensorial principal, núcleo motor, núcleo mesencefálico e núcleo do trato espinal, o qual concebe três subnúcleos: oral, interpolar e caudal. O núcleo motor abrange respostas motoras. O núcleo sensitivo principal é o lugar de transmissão dos efeitos de tato e propriocepção, gerando parcela da via epicrítica somestésica trigeminal (Figura 2). O trato espinal do trigêmeo, com seus 3 subnúcleos, é o lugar de transferência das sensações de temperatura, dor e pressão, fazendo parte da via protopática somestésica trigeminal (SESSLE, 2005; OKESON, 2003). De acordo com considerações comportamentais, clínicas e morfológicas, o subnúcleo caudal é o lugar mais importante de transmissão da mensagem nociceptiva da região orofacial do tronco cerebral, semelhante ao corno dorsal da medula espinhal para propagação da mensagem nociceptiva das demais partes do corpo (SESSLE, 2003).

Figura 2 – Mecanismo da Dor Orofacial.



Fonte: (CHAVES, 2011)

Pesquisas anatômicas têm indicado que axônios que inervam a área da face proximal a linha média fazem sinapses rostralmente no núcleo caudal do trigêmeo, enquanto os axônios que inervam áreas posteriores fazem sinapses primárias sucessivamente nas partes mais caudais deste núcleo. Conseqüentemente as regiões de sugestão de dor se repartiriam conforme a disposição das

fibras aferentes no núcleo espinal do trigêmeo, na região caudal, e não conforme a inervação dos diversos ramos trigeminais (WAITE, 2004; SESSLE, 2003).

A partir do subnúcleo caudal, as mensagens dão continuidade pelos neurônios secundários através do lemnisco trigeminal ventral até o núcleo talâmico ventral pósteromedial contralateral. Os neurônios de variação dinâmica ampla (WDR) são os neurônios de segunda ordem mais significativo para dor no subnúcleo caudal, assim como os neurônios nociceptivos específicos (NS). Por fim, um neurônio de terceira ordem conduzirá as mensagens dolorosas até o córtex somatossensorial, onde está contemplada a região da face (SANDWELL *et al.*, 2010; SESSLE, 2011).

Isso provoca a liberação de neurotransmissores, envolvendo glutamato e substância P, que estimularão neurônios localizados na medula espinhal (McKUNE *et al.*, 2015). Antes da mensagem nociceptiva alcançar o tálamo e córtex cerebral, ocorre a modulação tanto para eliminar quanto para ampliar a mensagem nociceptiva nos terminais centrais das fibras aferentes (SESSLE, 2009). Esse complexo modulador é constituído por uma equipe de estruturas no tronco encefálico, mesencéfalo, subcórtex e córtex que constituem um complexo de projeções descendentes para o conjunto trigeminal do tronco encefálico e corno dorsal da medula espinhal (MATTHEWS; SESSLE, 2005; OKESON, 2003). Vários mediadores químicos podem estar envolvidos na transmissão nociceptiva ou modulação dentro do SNC como glutamato e aspartato, ácido γ -aminobutírico (GABA) e substâncias opioides endógenas, como encefalinas e endorfinas, podendo atuar também na periferia nos nociceptivos aferentes (SESSLE, 2005).

2.4 Mediadores inflamatórios envolvidos na dor inflamatória da ATM

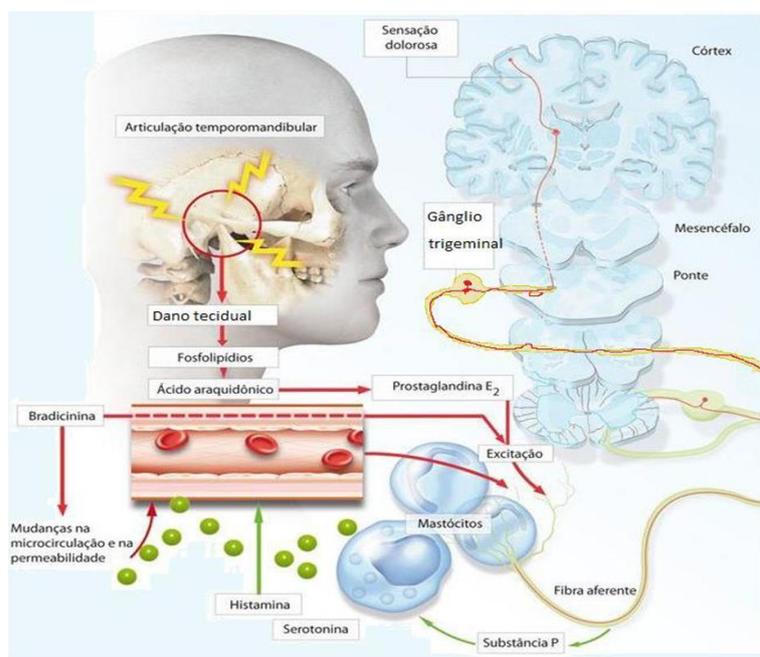
No decorrer do processo inflamatório, uma ampla quantidade de mediadores químicos é liberada e contribui ativamente nas fases desse processo, como quimiotaxia de células imunes, vasodilatação dos vasos sanguíneos, aumento da permeabilidade vascular, intensificação e sensibilização periférica dos nociceptores (Figura 3) (CHAVES *et al.*, 2011; SESSLE, 2011).

Para Cunha *et al.* (2005), depois de lesões teciduais, citocinas são liberadas por diferentes espécies de células e fazem uma conexão entre o dano tecidual e a evolução da nocicepção inflamatória aguda definida por hipernocicepção devido à sensibilização dos neurônios nociceptivos primários. A redução do limiar de disparo dos neurônios primários depende de TNF- α e IL-1 β , que, por sua vez, incentivam a formação de prostanoídes e aminas simpáticas. Diferentes citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, secretada por células T e macrófagos, também colaboram

para a instalação e manutenção da inflamação (ARENDRT-NIELSEN, 2015; CUNHA *et al.*, 2007, 2008; PINTO *et al.*, 2010).

As citocinas estão associadas de maneira direta com vários processos imunes relacionados com a patogênese na ATM. Diferentes citocinas são expostas e ativas funcionalmente em tecidos sinoviais e, quando acontece uma desordem internamente na ATM, as citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 são as que estão presentes em concentrações aumentadas no líquido sinovial (SLADE *et al.*, 2011). Essas citocinas mencionadas acima apresentam um importante papel na doença articular degenerativa, elevando o nível de degradação de colágeno, prejudicando a crondogênese e a remodelação reticular (SESSLE, 2005; KOSTRZEWA-JANICKA *et al.*, 2012).

Figura 3 - Mediadores Inflamatórios na Dor Orofacial



Fonte: Adaptado de OKESON, 1998

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida especialmente por monócitos, macrófagos e linfócitos-T35, participando das etapas iniciais do mecanismo inflamatório e da indução de outros mediadores inflamatórios como IL-1, IL-6 e prostaglandinas (PG) (FREDRIKSSON, ALSTERGREN e KOPP, 2006). Essa citocina exerce uma função essencial na evolução das DTMs (FURQUIM *et al.*, 2016). A sua expressão ampliada proporciona o começo e o desenvolvimento de várias doenças infamatórias da ATM. Esse acontecimento é comprovado através de respostas nos quais níveis aumentados de TNF- α na ATM relacionam-se de maneira positiva com reação inflamatória articular aguda e crônica, destruição do tecido conjuntivo e processo doloroso nessa articulação (AHMED *et al.*, 2015).

A IL-1 é formada por macrófagos, monócitos, fibroblastos e células dendríticas, da mesma forma que é expressa pelos linfócitos B, células NK e células epiteliais, tornando-se um dos mais relevantes marcadores indutor da resposta inflamatória, relacionada à infecção aguda (CONTASSOT; BEER; FRENCH, 2012). A intrincada estabilidade das moléculas e receptores da família IL-1 tem um forte impacto na homeostase da ATM. A IL-1 é uma das citocinas que apresenta maior prevalência nas DTM e responsável por uma sequência de cascata de eventos, que em última instância poderá acarretar em alterações nos tecidos (SORENSEN *et al.*, 2017).

A IL-1 β pode ser formada por macrófagos da membrana sinovial, assim como por condrócitos ou fibroblastos a partir de cartilagem articular. Pesquisas apontam que IL-1 β sensibiliza nociceptores e gera a hiperalgesia, agindo na fisiopatologia dolorosa da articulação da ATM em pacientes com DTM (KOSTRZEWA-JANICKA *et al.*, 2012; ALSTERGREN *et al.*, 2003). Sintomatologias dolorosas e hiperalgesias apresentam relação direta com o aumento na expressão de IL-1 β . A existência desta citocina no líquido sinovial da ATM demonstra a presença de uma lesão, uma vez que não existe a presença da citocina no líquido sinovial de ATM normal (ALSTERGREN, 2003).

O TNF- α juntamente com IL-1 β são citocinas pró-inflamatórias e também potentes indutores de diversas citocinas, como a IL-6. Na artrite reumatoide, essas citocinas são liberadas no sítio inflamatório, como também aparentam ser o causador da inflamação sistêmica. TNF- α e IL-1 aparentam não estarem presentes no líquido sinovial da ATM normal de indivíduos, porém destacam estar presentes no fluido sinovial da ATM de pacientes com artrite (AHMED *et al.*, 2015).

A IL-8 é utilizada como marcador para diferentes situações clínicas. O estímulo de IL-8 se dá através de mediadores inflamatórios como TNF- α , sendo capaz de existir em sua forma monomérica ou dimérica, com a competência de diferenciação e regulação de seus dois receptores de superfície. Ressalta-se seu instrumento de ação em situações patogênicas de diversas doenças inflamatória, como artrite reumatoide (TIPTON *et al.*, 2016). Conforme estudo de Kaneyama *et al.* (2002), foi constatado níveis elevados de IL-8 no líquido sinovial de pacientes portadores de DTM.

2.4.1 Via Hemeoxigenase-1 (HO-1)

A Hemeoxigenase (HO) foi originalmente identificada em 1969 por Tenhunen *et al.* que caracterizaram a atividade da enzima, assim como sua localização celular. A HO é uma enzima microsomal que catalisa a degradação do heme em monóxido de carbono (CO), biliverdina

(BVD) e ferro, e a biliverdina é reduzida pela enzima biliverdina redutase para produzir bilirrubina (CATALÁN; ALCARÁZ; FERRÁNDIZ, 2018). Três formas do HO (HO-1, HO-2 e HO-3) podem estar presente em ratos. Enquanto a HO-1 é diferente na estrutura das suas isoformas, HO-2 e HO-3 são muito semelhantes (cerca de 90 % de homologia), com a HO-3 apresentando pobre desempenho na degradação de heme. Constitutivamente expressa, a HO-2 foi identificada nos rins, músculo liso vascular, fígado, cérebro e baço (WUNDER; POTTER, 2003). Embora ambas isoenzimas, HO-1 e HO-2 degradem heme numa extensão similar e levem à geração dos mesmos produtos, foram apresentadas diferenças significantes entre as duas isoformas. Sob condições normais, a atividade da HO-2 supera em 2-3 vezes a atividade da HO-1. Entretanto, a atividade da HO-1 pode aumentar em até 100 vezes quando exposta a metais pesados e condições de estresse como hipóxia, hipertermia, dano celular, respondendo pela maior parte do catabolismo do heme e gerando produção de CO e BVD (TRAKSHEL *et al.*, 1986).

A HO-1 desenvolve uma importante função antioxidante no sistema de defesa e homeostase do ferro, além de estar possivelmente envolvida na regulação de diversas funções celulares, como proliferação, diferenciação e apoptose (PRZECZEK; DULAK; JOZKOWICZ, 2012). Em virtude de o grupo heme apresentar em sua forma toxicidade para as células, por incentivar a produção de radicais livres, ampliar a permeabilidade vascular, a expressão de moléculas de adesão e a infiltração de neutrófilos para o sítio inflamatório, HO apresenta função de proteção, destruindo-o e concedendo seus produtos finais (SCHULLER *et al.*, 1999).

Pesquisas tem relatado a interligação da ativação de HO-1 com a redução de dor neuropática periférica em ratos (BIJEM *et al.*, 2013). A HO-1 também está presente nos gânglios da raiz dorsal, nos gânglios trigeminais e nas regiões superiores das vias da dor, contribuindo nos mecanismos protetores e adaptativos (AKRAM *et al.*, 2016; SHEN *et al.*, 2015). Como mostra no estudo de Rossi *et al.* (2017), a HO-1 se apresenta também como via protetora contra isquemia-reperfusão renal (IRI) e poderia ser um objeto terapêutico relevante no transplante renal. Ademais, no estudo de Poss; Tonegawa (1997) foi observado que os camundongos que sofriam de deleção gênica da HO-1 não sobreviviam após o nascimento e aos que conseguiram de manter vivos exibem um atraso no desenvolvimento e anemia normocrômica, morrendo ainda no primeiro ano de vida. Ainda foi demonstrado na análise histopatológica que os rins e o fígado desses animais expressaram degradação de ferro e manifestaram acentuada reação inflamatória caracterizada por hepatoesplenomegalia e leucocitose. No ano de 2002, surgiu na literatura a primeira ocorrência de deficiência da expressão da HO-1 em seres humanos. Esse indivíduo exibia alterações semelhantes às aquelas que foram verificadas nos animais com deficiência de HO-1, envolvendo atraso do

crescimento, anemia, leucocitose e aumento da sensibilidade ao estresse oxidativo (KAWASHIMA *et al.*, 2002).

HO-1 é indutível por uma vasta série de estímulos e desempenha uma função interessante antioxidante no sistema de defesa e homeostase do ferro. Além disso, HO-1 está envolvida na normalização de diversas funções celulares, como proliferação, diferenciação e apoptose (GROCHOT-PRZECZEK; DULAK e JOZKOWICZ, 2012). Uma vasta gama de indícios indica que a HO-1 normaliza a ativação e função de diversos tipos de células de condução e a resposta inata adaptativa ao processo inflamatório e imunológico (BUSSEROLLES *et al.*, 2006; GARCIA-ARMANDIS *et al.*, 2010; CLERIGUES *et al.*, 2012). Consequentemente, a normalização positiva de HO-1 ou a administração dos seus metabólitos resultam em propriedades anti-inflamatórias e efeitos antioxidantes em muitos modelos de várias doenças (OROZCO; KAPTURCZAK; BARAJAS *et al.*, 2007), além de HO-1 desempenhar uma função importante no controle antinociceptivo modulando a dor aguda não inflamatória (CARVALHO; BRANCO; PANISSI, 2011).

Muitas pesquisas vêm revelando que a HO-1, seu substrato heme e seus produtos, CO e BVD, são eficazes na modulação do processo de inflamação. Como relata no estudo de Konrad *et al.* (2015) onde HO-1 não-mieloide foi interessante para o efeito antiinflamatório na migração de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) em diferentes compartimentos do pulmão e na permeabilidade microvascular. Outro estudo demonstra que o HO-1 mieloide apresenta proteção contra a resposta inflamatória a zymosan in vivo (BRINES; CATALÁN; ALCARÁZ; FERRÁNDIZ, 2018). Como relata no estudo de Chaves *et al.* (2018), a ativação das vias de HO-1/ BVD/ CO e HO/ CO/ GMPc/K⁺_{ATP} resulta efeitos antinociceptivos e antiinflamatórios sobre a hipernocicepção da articulação temporomandibular (ATM) de ratos.

2.4.2 Via NO/ GMPc/ PKG/ K⁺_{ATP}

O óxido nítrico (NO) é produzido por enzimas definidas como óxido nítrico sintases (NOS). Essa espécie de enzimas complexas catalisam a oxidação da L-arginina para gerar óxido nítrico e L-citrulina. Três formas de NOS foram a princípio definidas: a isoforma neuronal (NOS1), reconhecida no cérebro; a isoforma induzida (NOS2), identificadas em macrófagos e a isoforma endotelial (NOS3), reconhecidas em células endoteliais (HARRISON, 1997; MICLESCU *et al.*, 2009). A NOS1 e NOS3 mostram expressão constitutiva (NOSc) e geram baixa quantidade de NO,

quando ativadas por (Ca^{+2}), a NOS2 é expressa apenas em resposta inflamatória e pode gerar ampla quantidade de NO.

O NO pode estimular dentre as várias vias farmacológicas, a via da enzima guanilato ciclase solúvel (GC). O estímulo dessa via leva à formação do segundo mensageiro GMPc a partir da degradação enzimática do GTP. Esse segundo mensageiro executa ação diretamente na atividade de relevantes sistemas orgânicos, como o sistema nervoso central e o sistema cardiovascular (FRIEBE *et al.*, 2003; TAO *et al.*, 2000; SCHMIDTKO *et al.*, 2003).

Outro alvo relevante da via NO/ GMPc é a dor inflamatória. O estudo de Sachs *et al.*, em 2004, foi o primeiro a demonstrar que essa via leva à abertura de canais de potássio ATP dependentes ($\text{K}^{+}_{\text{ATP}}$), e que a abertura desses canais ocorre pela atividade da proteína quinase G (PKG) no meio intracelular do neurônio nociceptivo, caracterizando a via NO/ GMPc/ PKG/ $\text{K}^{+}_{\text{ATP}}$.

Na dor orofacial, Chaves *et al.* (2011) relata em seu estudo que inibidores de NOS, (L-NAME e 1400W) apresentaram efeito antinociceptivo e anti-inflamatória na artrite da ATM induzida por zymosan. Também, Lamana *et al.* (2017) mostra o modelo de hipernocicepção inflamatória da ATM com formalina, em que foi estudado o mecanismo de ação da droga tramadol, mostrando sua atividade antinociceptiva através da ativação intracelular NO/ GMPc.

2.4.3 Opioides

Os opiáceos são substâncias derivadas do ópio que agem nos receptores opioides, atuando como fármacos analgésicos utilizados frequentemente para tratamento de processo álgico de intensidade moderada a grave. São indicados tanto para tratamento de dor aguda como crônica, de origem oncológico e não oncológico (NASCIMENTO; SARATA, 2011). Estudo tem demonstrado que, em situação de estresse, os opioides endógenos são liberados dos tecidos inflamados e estimulam receptores periféricos opioides aptos a aliviar a dor (GARCIA; CARDOSO; DOS-SANTOS, 2012), modificando a concepção do quadro álgico e diminuindo também a sensibilização central (ALEIXO *et al.*, 2017).

Os receptores opioides estão extensamente distribuídos pelo SNC, sistema nervoso periférico (SNP), células endócrinas, células sinoviais e imunitárias como mastócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos. Existem três tipos de receptores opioides μ (mu/MOR), κ (kappa/KOR) e δ (delta/DOR) (MARVIZON *et al.*, 2010). Estes receptores apresentam sete domínios

transmembrana, são acoplados a proteína G e compartilham de homologia na sua estrutura. Os peptídeos opioides não se ligam exclusivamente a um tipo de receptor, mas apresentam afinidade maior ou menor por um determinado tipo. As endorfinas são os ligantes endógenos com maior afinidade ao receptor do tipo μ , ao qual a morfina se liga também com grande afinidade. As encefalinas ligam-se aos receptores δ com grande afinidade, e as dinorfinas ligam-se com maior afinidade aos receptores κ (PRZEWLOCKI e PRZEWLOCKA, 2001).

O receptor μ está presente no gânglio trigeminal e é modulado pelo processo inflamatório (LEE *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2014). As citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-4, IL-6 e TNF- α influenciam no aumento na expressão do receptor μ em células neuronais e não neuronais (BÖRNER; HÖLLT; KRAUS, 2002; BORNER, 2004; KRAUS *et al.*, 2001). No estudo de Macedo *et al.* (2016), foi relatado que o efeito antinociceptivo periférico 15d-PGJ é mediado pelo PPAR- γ , e este, uma vez ativado, estimula a liberação de β -endorfina e dinorfina que excitam os receptores opioides μ e δ .

Vários estudos têm demonstrado que os agonistas dos opioides desenvolvem efeito analgésico relevante na dor orofacial (ZHAN *et al.*, 2018). Zubrzycki *et al.* (2017) apresentou em seu estudo que as vias opioides e endocanabinoide 1 estão envolvidos no controle nociceptivo da dor orofacial, além disso demonstraram que o efeito antinociceptivo induzido por endomorfina-2 (EM-2) foi modulado pela etanolamina N- araquidonil (AEA) e mediada pelo receptor μ e receptor canabinoide 1 (CB1).

Em um estudo usando um modelo de dor inflamatória, Berg *et al.* (2011) demonstram que a ativação de KOR através do agonista KOR (-)-(trans)-3,-dicloro-Nmetil-N-[2-(1-pirrolidinil)ciclo-hexilo]benzeneacetamida (U50488) produz uma forte inibição da alodinia térmica estimulada por prostaglandina E2 (PGE₂) quando administrado diretamente na superfície plantar da pata traseira de rato em doses que não atuam sistemicamente.

2.5 Disfunção Temporomandibular (DTM)

A *American Association of Dental Research (AADR)* enfatiza que as disfunções temporomandibulares englobam um grupo de condições musculares e musculoesqueléticas que envolvem as articulações temporomandibulares, músculos mastigatórios e todos os tecidos associados. A sintomatologia associada a essas alterações são diversas, incluindo dificuldade em mastigar, falar ou em outras funções orofaciais. Esses transtornos também poderão estar associados à dor aguda ou persistente, e os pacientes muitas vezes apresentam co-morbidades. A dor crônica

ligada às DTMs pode interferir no trabalho ou em interações sociais, sucedendo em uma redução geral da qualidade de vida (GREENE *et al.*, 2010).

Os principais sinais e sintomas da DTM podem apresentar-se de diversas formas e pode incluir a dor e o desconforto na ATM; zumbidos no ouvido; algias da musculatura da mastigação e região cervical uni ou bilateral; ruídos articulares como crepitações e/ou estalidos; limitação da amplitude de movimento da mandíbula, desvios e/ou deflexão durante abertura bucal, dificultando a mastigação, além de cefaleias (BARBIERI; DAMASCENO, 2014).

Estudos epidemiológicos avaliam que a prevalência da sintomatologia da DTM é em torno de 40% na população geral segundo Gonçalves *et al.* (2010). A patologia pode acontecer em todas as faixas etárias, porém sua maior incidência está entre 20 a 45 anos de idade. O sexo feminino é a classe mais afetada pela DTM numa proporção de 3:1, podendo chegar à proporção 9:1, isso pode ter relação com as diferenças fisiológicas do sexo, como alterações hormonais, estrutura muscular e diminuição do limiar doloroso (FREIRE *et al.*, 2014).

A DTM apresenta etiologia multifatorial, podendo ser oriunda de um trauma muscular e articular, situações anatômicas (fatores esqueléticos) ou condições fisiopatológicas (problemas no osso, no tecido conjuntivo e alterações hormonais, de sensibilização das vias nervosas centrais e periféricas de processamento da dor do sistema) (AMIXNER *et al.*, 2011; CONTI *et al.*, 2012), além de fatores psicossociais, como ansiedade, estresse, depressão, assim como doenças sistêmicas e alterações do sono (FERREIRA *et al.*, 2009; TJAKKES *et al.*, 2010; NISHYAMA *et al.*, 2012).

Dentre as possibilidades terapêuticas, os fármacos mais prescritos e indicados para tratamento da dor na DTM estão os AINES (antiinflamatórios não esteroidais) (WIECKIEWICZ *et al.*, 2015). É conhecida a limitação acerca da comprovação da eficácia dessas drogas no tratamento de DTMs e a não indicação do uso contínuo das mesmas, devido aos efeitos adversos indesejáveis, como por exemplos as complicações gastrointestinais (CAIRNS *et al.*, 2010; FINE, 2013; GREENE, 2010). Diante dessa dificuldade, várias substâncias naturais estão sendo desenvolvidas como possíveis medicamentos (GONZÁLEZ *et al.*, 2017; STOHS e HARTMAN, 2015).

2.6 Moringa oleifera

As plantas medicinais são conhecidas há milhões de anos e são apresentadas como importantes ferramentas farmacêuticas para prevenir e curar várias patologias e enfermidades. De acordo com Organização Mundial de Saúde (OMS), em torno de 80% da população nos países

desenvolvidos utiliza plantas medicinais como tratamento de diversos distúrbios patológicos (ALHAKMANI; KUMAR; KHAN, 2013).

Para Park *et al.* (2011), a *Moringa Oleifera* Lamark é uma planta largamente utilizada na medicina popular em muitos países tropicais e subtropicais incluindo sub-Himalaia, regiões da Índia, Paquistão, Bangladesh, América do Sul, Ilhas do Pacífico e partes do Afeganistão. Além de apresentar um rápido crescimento, a *Moringa Oleifera* pertence à família Monogênica Moringaceae, que inclui 13 espécies de árvores e arbustos.

A maioria das partes da folha apresenta diversas fontes nutricionais e terapêuticas, ricas em proteínas, carotenoides, minerais e ácido ascórbico, sendo utilizada como suplemento alimentar em animais e seres humanos e também utilizado pela medicina humana para tratamento de diferentes patologias. As folhas da *Moringa* apresentam grande utilidade na prevenção da desnutrição e as sementes são utilizadas com segurança na purificação da água. Além das folhas, as flores, raízes, goma e frutas são altamente empregadas para tratamento dos processos inflamatórios (ALHAKMANI; KUMAR; KHAN, 2013), pois apresenta ricos nutrientes, flavonoides e substâncias ativas, com boa função de cuidados terapêuticos sendo conhecida como a árvore mágica e árvore da vida (YI *et al.*, 2017).

As flores da planta *Moringa Oleifera* exibem alto teor de minerais como potássio, ferro, cálcio e antioxidantes, além das vitaminas essenciais como aminoácidos e alguns glicosídeos e são aplicados na dieta humana, especialmente nas Filipinas. As sementes apresentam rico teor de óleo comestível, sendo aproveitado também para usos medicinais (GYEKE *et al.*, 2014).

A planta *Moringa Oleifera* é utilizada para diversas patologias entre elas cardíacas, oculares, processos inflamatórios e dispepsia. Estudos farmacológicos têm demonstrado que *Moringa Oleifera* apresenta ação antioxidante, antitumoral, antiinflamatória, propriedades antiespasmódicas e antidiuréticas, podendo estar relacionados à presença de metabólitos vegetais presentes na planta, como as vitaminas, minerais, aminoácidos, glicosídeos, caretenoides, flavonoides e fenólicos (BAKRE; ADERIBIGBE; ADEMOWO, 2013).

Alhakmani; Kumar; Khan (2013) demonstraram a ação antiinflamatória da flor de *Moringa Oleifera*, por apresentar em seu composto substâncias ricas em compostos fenólicos e também apresentou importante ação antioxidante, por isso a indicação como fonte natural de antioxidantes para prevenir a progressão de muitas doenças, porém são sugeridas mais investigações a fim de se avaliar os mecanismos e constituintes por existentes por trás de suas ações anti-inflamatórias.

Já no estudo de Mishra *et al.* (2013) onde foi realizada uma investigação fitoquímica de todas as partes da planta *Moringa Oleifera*, foi constatado que cada parte possui propriedades benéficas que podem servir a humanidade, o extrato da flor da *Moringa Oleifera* mostrou a presença de compostos antioxidantes, além de apresentar ação anti-inflamatória, antiviral, antitumoral, dentre outros.

Já no estudo de Tan; Arulselvan; Karthivashan; Fakurazi (2015) onde foi investigado o efeito anti-inflamatório da atividade do extrato hidroetanólico a 80% da flor de *M. oleifera* em mediadores pró-inflamatórios e citocinas produzidas em macrófagos e a partir dos resultados conseguiu-se concluir que extrato hidroetanólico da flor de *M. oleifera* possui ação antiinflamatória relacionada à sua inibição de NO, PGE2, citocinas próinflamatórias e produção de mediadores inflamatórios em macrófagos.

Santos *et al.*, em 2018, mostraram em estudo pré-clínico que os derivados semissintéticos das flores da *Moringa oleifera* Lam. apresentaram um efeito antinociceptivo e antiinflamatório na ATM de rata quando administradas por via oral. Outro estudo realizado por Silveira (2017) demonstrou que extrato das flores da *Moringa oleifera* apresentou efeito antinociceptivo e anti-inflamatório na ATM de rata quando administrado por via oral

3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A dor é uma sensação desagradável, que acarreta incômodo aos pacientes com DTM na região da musculatura e articulação, sendo na maioria das vezes uma fonte comum de dor orofacial crônica, o que pode repercutir na ausência do trabalho ou interações sociais, resultando em uma diminuição na qualidade de vida das pessoas acometidas (GREENE *et al.*, 2010). Em consequência da dificuldade no método de tratamento para as situações inflamatórias nas DTM, como também à procura de um maior entendimento acerca dos mecanismos envolvidos, o progresso de instrumentos possíveis no tratamento da dor inflamatória, tem otimizado as pesquisas por novas drogas à base de produtos naturais como uma possibilidade de associação aos tratamentos convencionais (VAL *et al.*, 2014).

Muitos fármacos comercializados apresentam estruturas químicas relacionadas a uma substância extraída de alguma espécie botânica de uso consagrado na medicina popular. O interesse em medicamentos derivados de plantas superiores aumentou expressivamente na última década. Estimativas atuais evidenciam que mais de 80 % da população dos países em desenvolvimento dependem da medicina popular ou de medicamentos à base de plantas como fonte primária de cuidados à saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

A busca pela apropriação e utilização de tratamentos naturais para alívio da dor e inflamação nos pacientes com DTM através de plantas medicinais já é uma prática frequente. Existem na literatura várias pesquisas com características terapêuticas dos diversos extratos da planta *Moringa Oleifera* utilizada com diferentes finalidades de tratamento da medicina, inclusive para tratamento de processos inflamatórios (FAIZAL *et al.*, 2014).

A alta atividade analgésica e baixa toxicidade dos derivados e a falta de estudos dos mecanismos de ação justificam o presente estudo acerca da importância dos mecanismos de ação de dois compostos semissintéticos MC-D7 e MC-D9 obtidos a partir do isoticianato MC-1 isolado das flores de *Moringa Oleifera* na ATM de ratos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o mecanismo de ação antinociceptivo e anti-inflamatório de dois compostos semissintéticos MC-D7 e MC-D9 obtidos a partir de um benzilisoticianato isolado das flores de *Moringa Oleifera* na ATM de ratos.

4.2 Objetivos Específicos

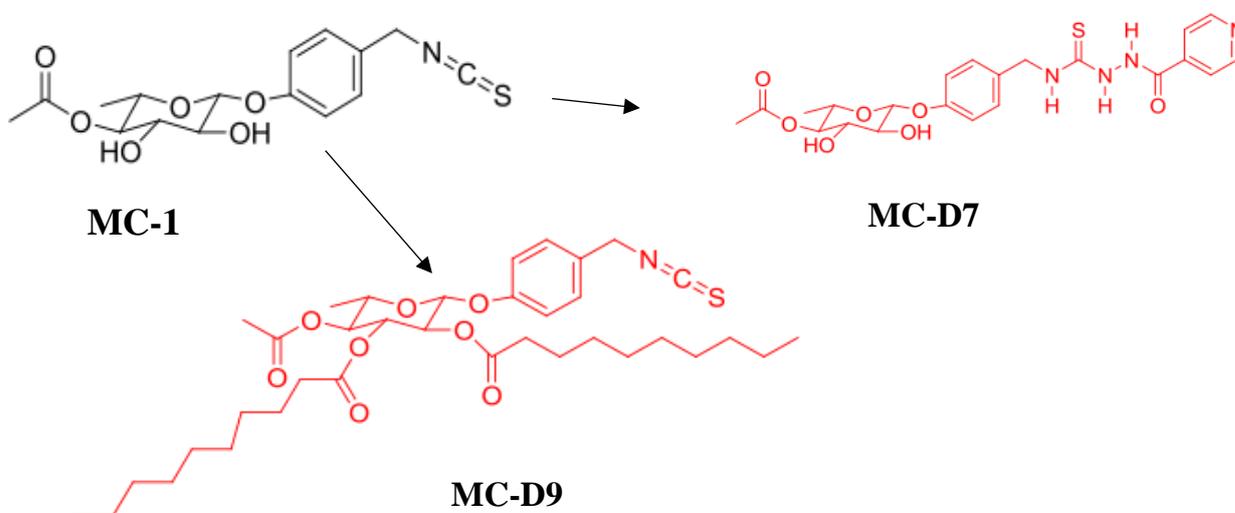
- Entender o papel da via do óxido nítrico (NO / GMPc / PKG / K⁺_{ATP}) na antinocicepção induzida por MC-D7 e MC-D9 no modelo de hipernocicepção induzida por formalina na ATM de ratos;
- Estudar a participação da via da hemeoxigenase-1 (HO-1 / GMPc / PKG / K⁺_{ATP}) na antinocicepção induzida por MC-D7 e MC-D9 no modelo de hipernocicepção induzida por formalina na ATM de ratos.
- Investigar o papel dos receptores opioides na antinocicepção induzida por MC-D7 e MC-D9 no modelo de hipernocicepção induzida por formalina na ATM de ratos;

5 METODOLOGIA

5.1 Obtenção do derivado semissintético MCD-7 e MCD-9

O composto MC-1 foi isolado das flores de *M. oleífera* conforme procedimento descrito em Almeida et al. (2017), bem como a obtenção de dois derivados semissintéticos MC-D7 e MC-D9 (figura 4).

Figura 4 – Derivados MC-1 (MC-D7 e MC-D9)



5.2 Animais

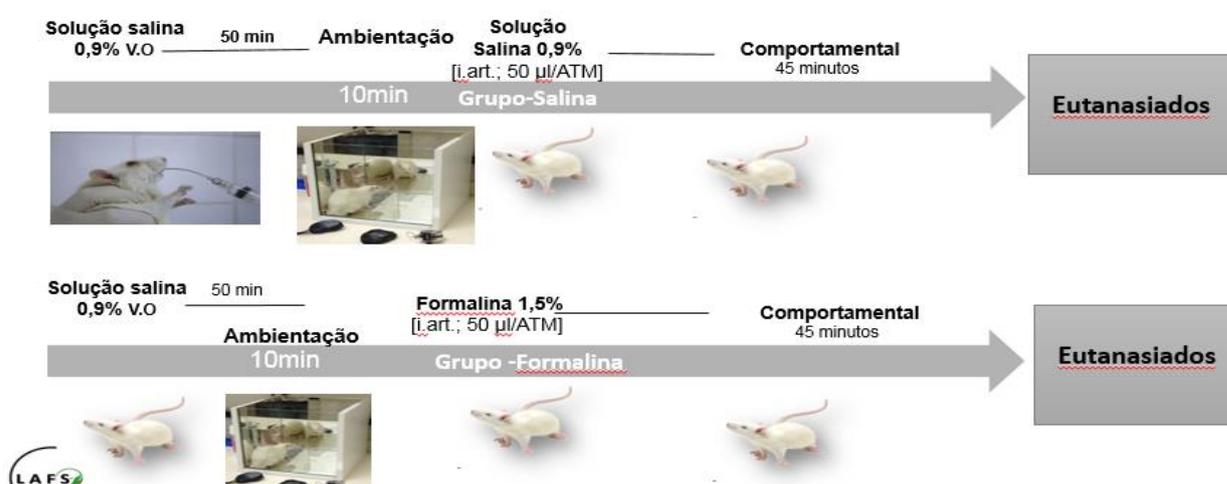
Foram utilizados 198 ratos Wistar machos entre 180 e 240g em grupos com N=5 animais, sendo estes, alojados em gaiolas de plástico padronizadas com alimentos e água disponíveis *ad libitum*. Eles foram mantidos em uma sala com temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) com um ciclo luz-escuro de 12/12 horas. Todos os experimentos foram projetados para minimizar o sofrimento usando o número mínimo de animais necessários para obter uma avaliação estatística válida. Os animais eram provenientes do biotério central da Universidade Federal do Ceará, com número de registro de CEUA 03/2015.

5.3 Eficácia antinociceptiva e anti-inflamatória de MC-D7 e MC-D9 no modelo de hiperalgia inflamatória induzida na articulação temporomandibular (ATM) de ratos.

5.3.1 Delineamento experimental

Os animais foram pré-tratados por via oral (v.o.), com solução salina (0,9%), indometacina (5 mg/kg), MC-D7 (1 µg/kg) ou MC-D9 (1 ng/kg). Após 60 minutos, foi aplicada injeção intra-articular (i.a.) de solução salina (50 µl, 0,9%) no grupo controle ou formalina (50 µl, 1,5%), na ATM esquerda. A resposta nociceptiva foi mensurada pela quantificação em segundos do ato do rato coçar a região da ATM esquerda e pelo número de vezes de erguer a cabeça de forma reflexiva no período de 45 minutos (ROVERONI *et al.*, 2001).

Figura 5 – Delineamento Experimental Grupo Salina



Fonte: própria

5.3.2 Injeções intra-articulares

Os animais receberam uma injeção intra-articular na ATM esquerda na região inferior, a porção póstero-inferior da borda do arco zigomático, em direção anterior, até contactar a região póstero-lateral do côndilo, com uma agulha de 30G conectada a um tubo de polietileno P50 e uma seringa de 50 µl (Hamilton) (**figura 6**) sob uma prévia anestesia inalatória com isoflurano (ROVERONI *et al.*, 2001).

Figura 6 – Seringa de Hamilton

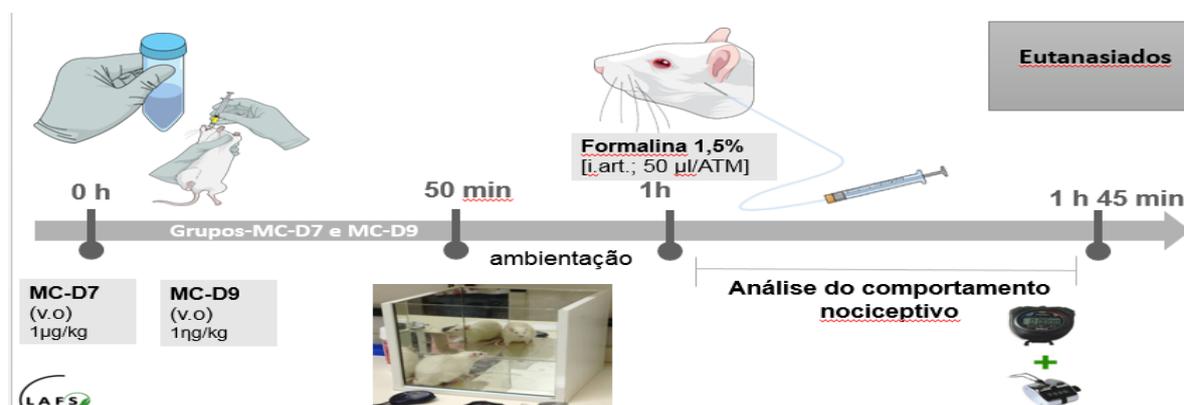


Fonte: ROVERONI *et al.*, (2001)

5.3.3 Testes comportamentais para a avaliação da resposta nociceptiva induzida pela formalina

Cada animal foi utilizado em um único experimento, sendo os testes realizados durante a fase clara entre 9h e 17h em uma sala silenciosa com temperatura controlada entre $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (ROSLAND *et al.*, 1991). Durante 7 dias antes do experimento os animais foram manipulados pelos participantes (TJOLSEIN *et al.*, 1992). Cada animal foi colocado em uma câmara de madeira com sua parte superior aberta tendo uma parede de vidro para observação e as demais paredes e base espelhados de dimensão 30x30x30 cm, sendo colocados durante 10 minutos antes da administração intra-articular para ambientação (ABBOTT *et al.*, 1986). Os animais não tiveram acesso a alimentos ou a água durante o experimento. Após anestesiados e administrado a injeção intra-articular, os animais foram colocados em câmara e observados seu comportamento pela quantificação em segundos do ato de coçar a região da ATM esquerda com um cronômetro digital e pelo número de vezes de erguer a cabeça com um contador manual de células no período de 45 minutos, em 15 blocos de 3 minutos e eutanasiados no final do experimento (OLIVEIRA-FUSARO *et al.*, 2012; ROVERONI *et al.*, 2001).

Figura 7 – Delineamento experimental grupo formalina

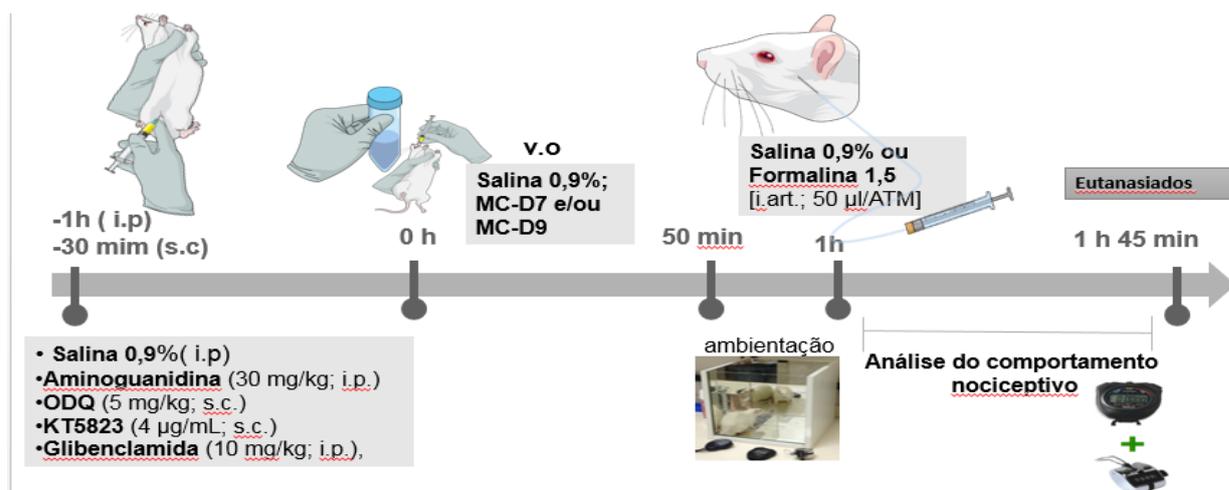


Fonte: própria

5.3.4 Papel da via do NO / GMPc / PKG / K⁺_{ATP} na antinociceção induzida por MC-D7 e MC-D9

Os ratos foram pré-tratados (60 min) com aminoguanidina (30 mg/kg; ip), um inibidor seletivo da sintase induzida do óxido nítrico (iNOS), 30 min antes com ODQ (5 mg/kg; sc), um inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel (cGMP), KT5823 (4 µg/ml, sc), um inibidor da proteína quinase G (PKG), ou 1h antes com glibenclamida (10 mg/kg; ip), um bloqueador dos canais de potássio sensível ao ATP (K⁺_{ATP}) seguido pela administração de MC-D7 (1 µg/kg; v.o) ou MC-D9 (1 ng/kg; v.o.) administração 1 h antes da injeção intra-ATM de formalina a 1,5% (50 µl/ATM). As respostas de nociceção comportamental foram avaliadas para uma observação de período de 45 min.

Figura 8 – Delineamento experimental grupo da via NO / GMPc / PKG / K⁺_{ATP}



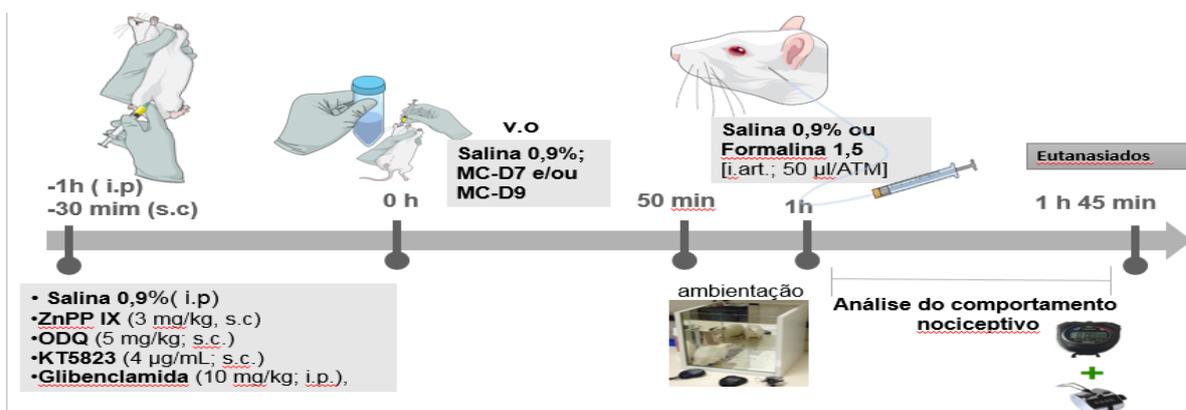
Fonte: própria

5.3.5 Envolvimento da via HO-1/ GMPc / PKG / K⁺_{ATP} na antinociceção induzida por MC-D7 e MC-D9

Os animais foram pré-tratados (30 min) com ZnPP-IX (3 mg/kg, sc), um inibidor específico do HO-1; ODQ (5 mg/kg; sc), um inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel (cGMP), KT5823 (4 µg/ml, sc), um inibidor da proteína quinase G (PKG), ou 1h antes com glibenclamida (10 mg/kg; ip), um bloqueador dos canais de potássio sensível ao ATP (K⁺_{ATP}) seguido pela administração

do MC-D7 (1 µg/kg; v.o) ou MC-D9 (1 ng/kg; v.o) 1h antes da injeção intra-ATM de formalina (1,5%, 50 µg/ATM). Respostas de nociceção comportamental foram avaliadas por um período de observação de 45 minutos.

Figura 9 – Delineamento experimental grupo da via HO-1/ GMPc / PKG / K⁺ATP

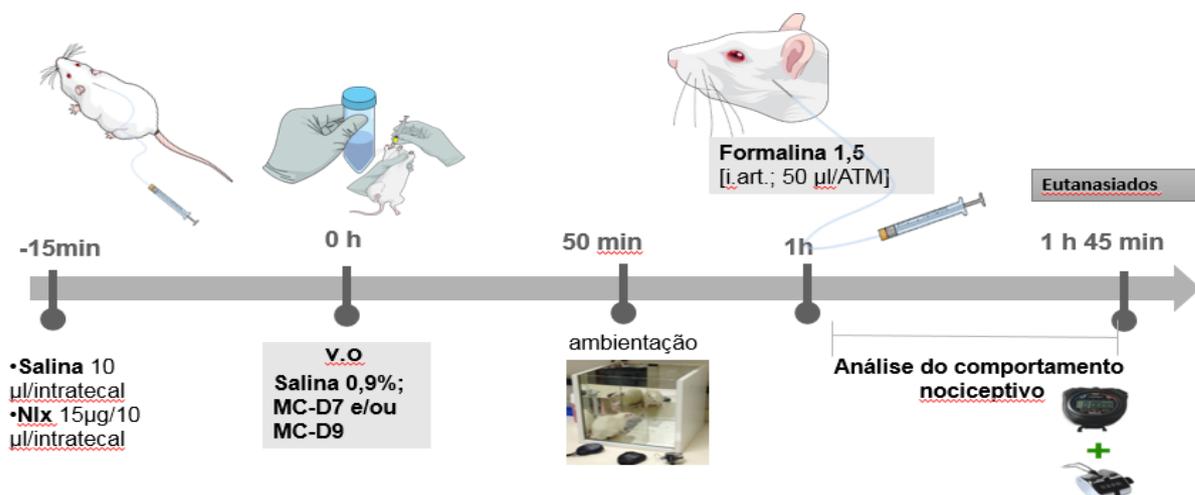


Fonte: própria

5.3.6 Estudo da via opioide central na antinociceção induzida por MC-D7 e MC-D9

Em outra série de experimentos, os ratos receberam anestesia com isoflurano por um período curto e tomaram uma injeção intratecal de naloxona (15 µg/10 µl) antagonista opioide não-seletivo, após 15 minutos, os ratos receberam MC-D7 (1 µg/kg) ou MC-D9 (1 ng/kg) ou solução salina (v.o.) e 1h após receberem uma injeção intra-ATM de formalina (1,5%, 50 µl). As respostas de nociceção comportamental foram avaliadas para uma observação de período de 45 min.

Figura 10 – Delineamento experimental grupo da via opioide



Fonte: própria

5.4 Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados como médias \pm EPM para dados paramétricos. Todos os testes foram realizados usando o programa SPSS 23.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) para o Windows. Todos os gráficos foram feitos com o software GraphPad Prism 6 (software GraphPad Prism, La Jolla, CA, EUA) para Windows. Nível de Probabilidade ($p < 0,05$) foi considerado. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar se os dados de cada variável analisada apresentavam-se com distribuição normal (dados paramétricos, com grupos com menos de 50 casos). Os valores de outliers foram retirados (quando ocorreram), por não representarem os resultados que o estudo tinha o objetivo de generalizar ($p\text{-valor} > 0,05$ para o teste de Shapiro-Wilk).

Os dados paramétricos foram analisados através do teste t de Student, para a comparação da média entre dois grupos, e do teste de ANOVA, para a comparação das médias em variáveis com mais de dois grupos. O pós-teste (post-hoc) para a ANOVA foi definido a partir da análise da homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Caso houvesse homogeneidade de variâncias ($p\text{-valor} \geq 0,05$), foi definido como pós-teste para a ANOVA o teste de Tukey. Caso não houvesse homogeneidade de variâncias entre os dados ($p\text{-valor} < 0,05$), foi definido como pós-teste para a ANOVA o teste de Games-Howell.

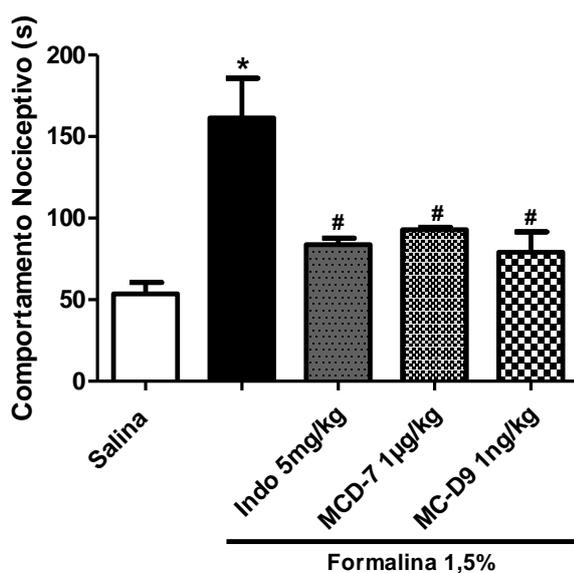
Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão (SD), com intervalo de confiança (CI) (máximo e mínimo), a fim de determinar a possível associação entre os grupos e cada variável analisada.

6 RESULTADOS

6.1 Efeito do MC-D7 e MC-D9 na hipernociceção inflamatória induzida por formalina na ATM esquerda de ratos

A injeção de formalina 1,5% (i.a) resultou em um aumento significativo na resposta comportamental nociceptiva ($176,3 \pm 24,78$) em comparação com o grupo salina ($53,56 \pm 7,081$) ($p < 0,001$). O tratamento com MC-D7 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($92,83 \pm 1,641$) ($p < 0,001$) e MC-D9 $1 \text{ng}/\text{kg}$ ($79,13 \pm 12,47$) ($p < 0,0001$) diminuiu significativamente o resultado comportamental nociceptivo quando comparados ao grupo formalina, mostrando resposta similar ao grupo indometacina $5\text{mg}/\text{kg}$ ($83,75 \pm 4,008$) (Figura 11).

Figura 11. Efeito do MC-D7 e MC-D9 na hipernociceção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos.



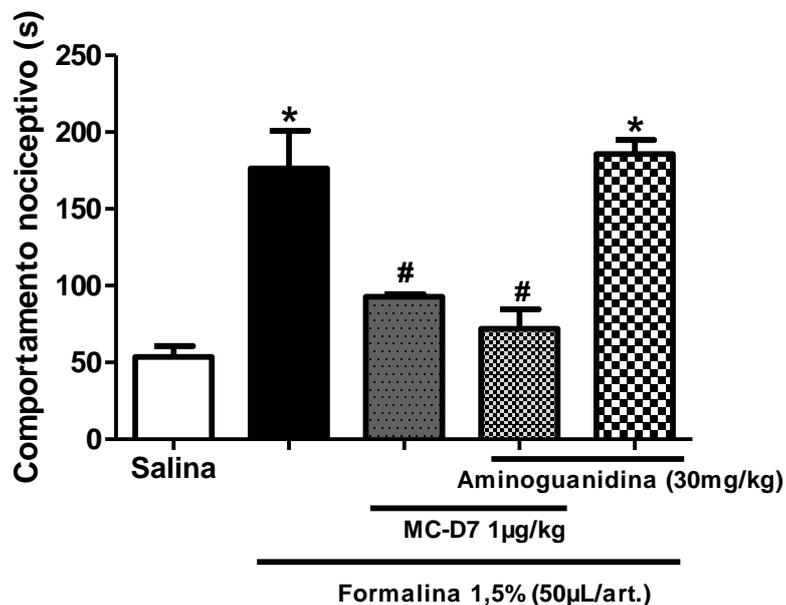
Fonte: Dados da pesquisa

Figura 11. MC-D7 ($1 \mu\text{g}/\text{kg}$, v.o) e MC-D9 ($1 \text{ng}/\text{kg}$, v.o) reduziram a hipernociceção inflamatória induzida por formalina. * $p < 0,05$ comparado com grupo salina. # $p < 0,05$ comparado com grupo formalina (ANOVA, Tukey).

6.2 Envolvimento do NO/GMPc/PKG/ K^+_{ATP} na atividade antinociceptiva do MC-D7 na hipernociceção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM esquerda de ratos.

O controle positivo aminoguanidina, inibidor seletivo da NO sintase induzida (NOSi) aumentou os comportamentos nociceptivos ($185,8 \pm 9,00$). O grupo MC-D7 ($72 \pm 12,77$) juntamente com pré-tratamento com aminoguanidina não foi capaz de reverter o efeito nociceptivo quando comparado ao grupo MC-D7 ($1 \mu\text{g}/\text{kg}$) de forma estatisticamente significativa ($92,833 \pm 1,641$). O grupo aminoguanidina ($185,8 \pm 9,00$) quando administrado sozinho, não alterou a resposta nociceptiva quando comparado ao grupo formalina (**Figura 12**).

Figura 12. Envolvimento da via NO/GMPc/PKG/ K^+ _{ATP} na atividade antinociceptiva do MC-D7



Fonte: Dados da pesquisa

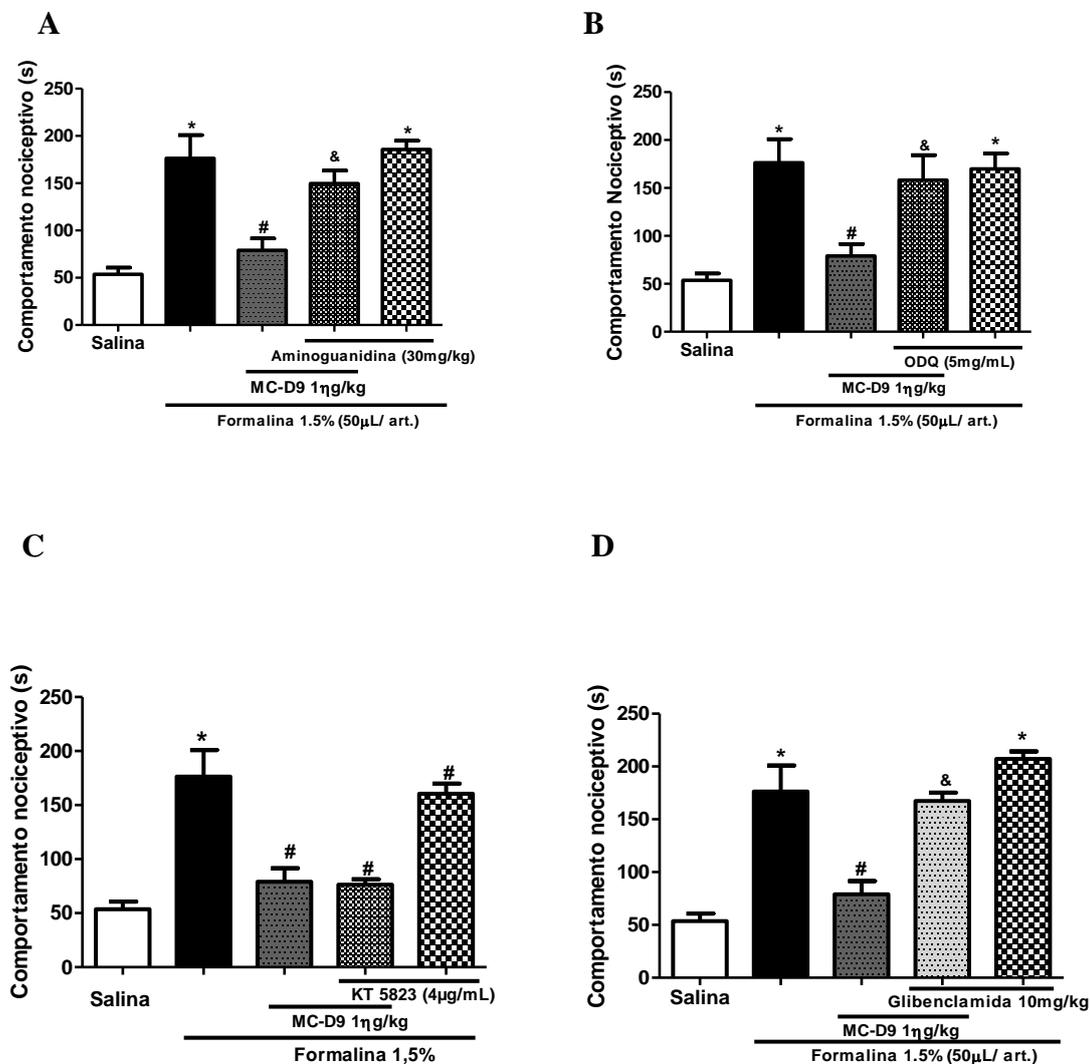
Aminoguanidina não reverteu a resposta nociceptiva de MC-D7. * $p < 0,05$ comparado com grupo salina. # $p < 0,05$ comparado com grupo formalina. ($p < 0,706$. ANOVA, Games-Howell).

6.3 Envolvimento do NO/GMPc/PKG/ K^+ _{ATP} na atividade antinociceptiva do MC-D9 na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM esquerda de ratos.

O inibidor de iNOS aminoguanidina ($185,80 \pm 9,00$) ($p < 0,004$) (Figura 13A), ODQ, um inibidor específico do cGMP solúvel ($184,75 \pm 7,66$) ($p < 0,007$) (Figura 13B), glibenclamida, um bloqueador de canais K^+ _{ATP} ($207,25 \pm 6,93$) ($p < 0,0001$) (Figura 13D) reverteram o efeito antinociceptivo efeito da MC-D9 na hipernocicepção da ATM induzida pela formalina, quando comparados ao grupo MC-D9 ($79,125 \pm 12,46$), porém KT 5823, o inibidor da proteína Quinase

G ($76,33 \pm 4,97$) (figura 13C) não reverteu efeito antinociceptivo da MC-D9 na hipernocicepção da ATM.

Figura 13. Envolvimento do NO / GMPc / PKG / K⁺ATP no efeito antinociceptivo do MC-D9



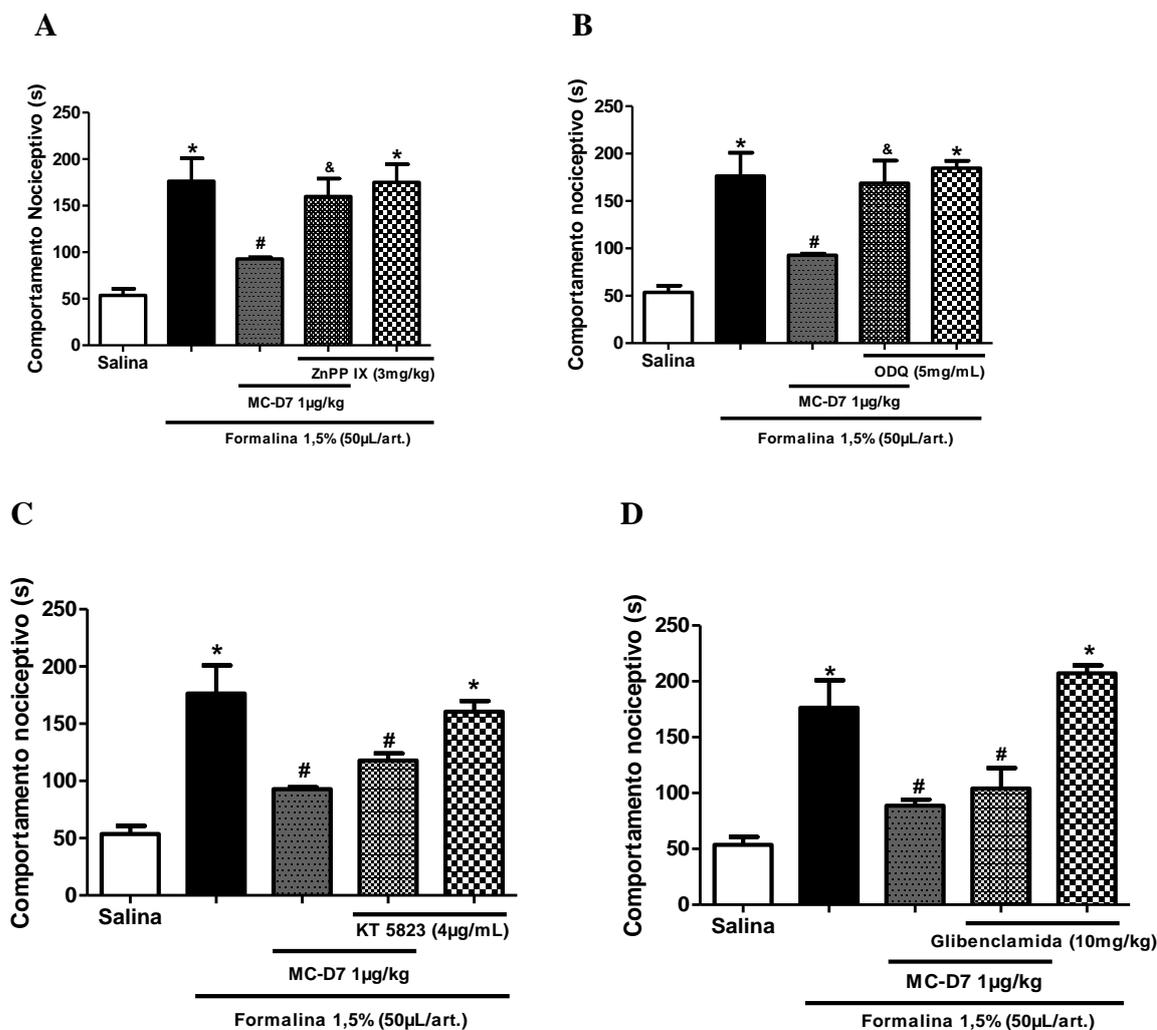
Fonte: Dados da pesquisa

(A): Aminoguanidina (30 mg/kg; i.p.); (B) ODQ (5 mg / kg; s.c.) e (D) Glibenclamida (10mg/kg, i.p) reverteram a resposta nociceptiva de MC-D9. $p < 0,004$; $p < 0,007$; $p < 0,0001$ respectivamente, porém (C): KT 5823 (4μg/mL) não reverteu os efeitos antinociceptivos do MC-D9 (ANOVA, Tukey).

6.4 Envolvimento da via HO-1/ GMPc/ PKG/ K⁺ATP na atividade antinociceptiva do MC-D7 na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM esquerda de ratos.

O inibidor seletivo a HO-1 ZnPP-IX (3 mg/kg; s.c.) reverteu o efeito antinociceptivo do MC-D7 (1 µg/kg; v.o) (193,50±7,751) na hipernocicepção da ATM induzida por formalina (p<0,0001), quando comparado ao grupo MC-D7 (92,83±1,46) (Figura 14A). ODQ (5mg/mL), um inibidor seletivo da guanilato ciclase (GC), reverteu o efeito MC-D7 (184,75±7,66) (p<0,005), quando comparado ao grupo MC-D7 (92,83±1,46) (Figura 14B). O KT5823 (160,5±9,313) (Figura 14C), um inibidor seletivo da proteína quinase G (PKG), e a glibenclamida, um bloqueador de canal do canal K⁺_{ATP} (207,25±6,93) (Figura 14D), não reverteram o efeito antinociceptivo do MC-D7 na hipernocicepção da ATM induzida pela formalina (**Figura 14**).

Figura 14. Envolvimento da via HO-1/ GMPc/ PKG/ K⁺_{ATP} na atividade antinociceptiva do MC-D7 na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM esquerda de ratos.



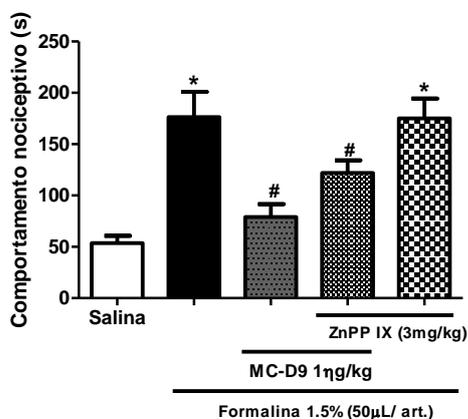
Fonte: Dados da pesquisa

(A): Pré-tratamento com zinco protoporfirina IX (ZnPP IX; 3 mg/kg) reverteu os efeitos antinociceptivos do MCD-7 ($p < 0,0001$); (B): pré-tratamento com ODQ (5mg/mL), reverteu os efeitos antinociceptivos do MC-D7($p < 0,005$); (C): pré-tratamento com KT 5823 (4 μ g/mL) não reverteu os efeitos antinociceptivos do MC-D7($p < 0,429$); (D): pré-tratamento com glibenclamida (10mg/kg) não reverteu os efeitos antinociceptivos do MCD-7($p < 0,992$) (ANOVA, Tukey).

6.5 Envolvimento da HO-1/ GMPc/ PKG/ K⁺ATP na atividade antinociceptiva do MC-D9 na hipernociceção inflamatória aguda induzida por formalina em ratos.

O inibidor seletivo da hemeoxigenase-1 (HO-1) ZnPP-IX não reverteu o efeito antinociceptivo do MC-D9 ($193,00 \pm 7,75$) quando comparado com o grupo MC-D9 ($79,125 \pm 12,46$). O grupo ZnPP-IX (3 mg/kg) ($193,00 \pm 7,75$), quando administrado sozinho, não alterou a resposta nociceptiva comportamental, quando comparado ao grupo formalina (**Figura 15**).

Figura 15. Envolvimento da HO-1/ GMPc/ PKG/ K⁺ATP na atividade antinociceptiva do MC-D9 a hipernociceção inflamatória aguda induzida por formalina em ratos.



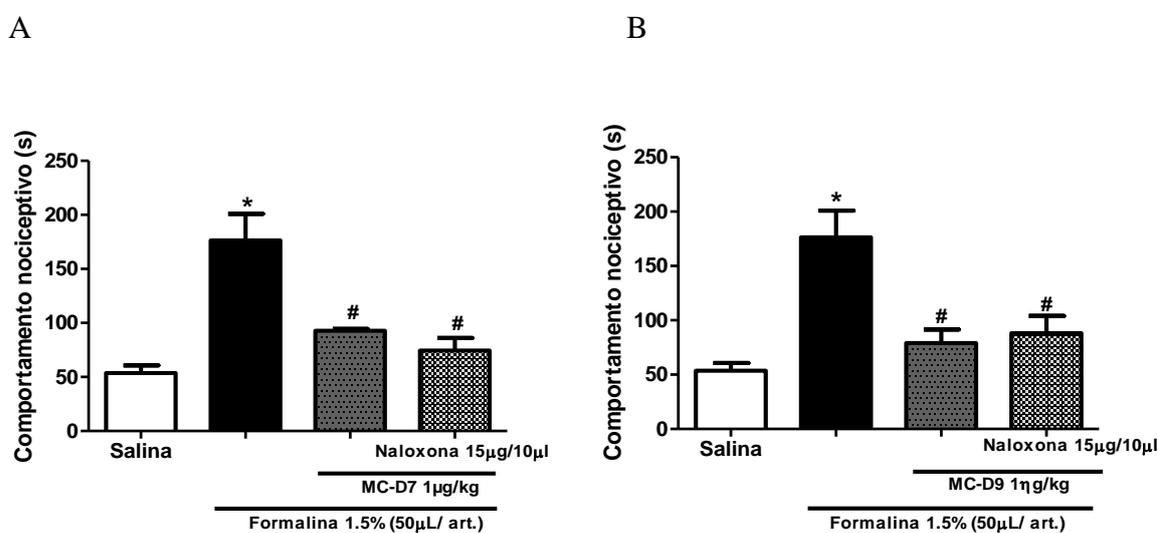
Fonte: Dados da pesquisa

Figura 15. Zinco protoporfirina IX (ZnPP IX; 3 mg/kg) não alterou o efeito antinociceptivo do MC-D9 ($p < 0,133$) $p < 0,05$ em relação ao grupo salina, # $p < 0,05$ em relação ao grupo formalina (ANOVA, Tukey).

6.6 Envolvimento da via opioide na atividade antinociceptiva do MC-D7 e MC-D9 na hipernociceção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM esquerda de ratos

O antagonista não-seletivo dos receptores opioides naloxona (15µg/10µL, i.t.) não reverteu o efeito do MC-D7 (74,4± 11,79) (**Figura 16A**) e MC-D9 (79,125±12,46) (**Figura 16B**) de forma estatisticamente significativa, quando comparado aos grupos MC-D7 (92,83 ± 1,641) e MC-D9 (79,13 ± 12,47), respectivamente.

Figura 16. Envolvimento da via opioide na atividade antinociceptiva do MC-D7 e MC-D9.



Fonte: Dados da pesquisa

(A): Naloxona não reverteu o efeito do MC-D7 (1 µg/kg;v.o). **(B):** Naloxona não reverteu o efeito do MC-D9 (1 µg/kg;v.o). *p < 0,05 em relação ao grupo salina, #p < 0,05 em relação ao grupo formalina (ANOVA, Tukey).

7 DISCUSSÃO

Estudos prévios do grupo demonstraram que os derivados MC-D7 e MC-D9 são eficazes em reduzir a hipernocicepção induzida por formalina na ATM de ratos, o que foi confirmado em nosso estudo (SANTOS *et al.*, 2016).

No resultado sugere que o MC-D7 atua também pela via da HO-1/GC/GMPc. Ainda, ao encontro do nosso estudo, Chaves *et al.* (2018) relataram que a ativação da via de HO-1/BVD/CO apresenta efeitos antinociceptivos e antiinflamatórios sobre a hipernocicepção da ATM. No estudo Do Val *et al.* (2014) foi observado que a *T. Toxicaria* é eficaz no efeito antinociceptivo no modelo de ATM e em partes depende da via HO-1 e dos canais de K^+_{ATP} . Corroborando com nosso estudo Silveira (2017) descreve que MC-H (outro composto semissintético derivado do benzilisotiocianato MC-1) também age pela via da HO-1. Alves *et al.* (2017) atestou que os efeitos do ranelato de estrôncio sobre o hipernocicepção inflamatória na ATM induzida por zymosan não foram alterados na presença de ZnPP-IX, demonstrando que o mecanismo independe da via HO-1. No estudo de Freitas *et al.* (2016) comprovou que *Abelmoschus Esculentus* apresenta respostas antinociceptivos e antiinflamatórios sobre a hipernocicepção da ATM, sendo dependente da via HO-1, uma vez que o ZnPP-IX reverteu o efeito antinociceptivo do *Abelmoschus Esculentus* sobre a hipernocicepção da ATM de ratos.

Corroborando com nossos dados, Carvalho; Branco; Passini (2011) demonstram que a ativação da via HO/CO/GMPc promoveu efeito antinociceptivo, confirmado pelo ODQ (inibidor de guanilato ciclase) ter bloqueado o efeito antinociceptivo. O estudo Braines *et al.* (2018) revelou que HO-1 apresenta função importante na regulação da migração de neutrófilos e na formação de mediadores inflamatórios no decorrer da resposta aguda ao Zynosan in vivo.

Vários estudos têm demonstrado que o HO-1 atua na regulação do sistema inflamatório (BRAINES *et al.*, 2018) e imunológico, além de propriedade antioxidante em diferentes modelos de doença como artrites (CHAVES *et al.*, 2018); diabetes (CASTANY *et al.*, 2016; GARCIA *et al.*, 2017); lesão isquêmica renal (ROSSI *et al.*, 2017); osteoartrite (CLÉRIGUES *et al.*, 2012); lesão pulmonar (KONRAD *et al.*, 2015).

Conforme demonstra nossos resultados, podemos observar que mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo de MC-D9 agem pela via NO/cGMP/ K^+_{ATP} . O óxido nítrico (NO), apesar de apresentar efeito dual ao atuar em ambos as funções pró-inflamatório e anti-inflamatório, apresenta-se na maioria das vezes essencial na preservação do processo inflamatório (CHAVES *et al.*, 2011).

Corroborando em partes com nossos dados, Silveira (2017) expressa em seu estudo que a glibenclamida reverteu os efeitos antinociceptivos mediados pelo MC-H, já os demais aminoguanidina, ODQ divergem dos nossos resultados, uma vez que não alteraram a resposta antinociceptiva do MC-H. De acordo com nossos estudos Florentino et al. (2015) comprova que os efeitos antinociceptivos do LQFM-021 (compostos do pirazol) foram mediados através da via NO/cGMP/K⁺ATP. Ainda conforme nosso resultado Fávaro-Moreira (2009) demonstrou em seu estudo que o estradiol apresenta efeito antinociceptivo em modelo de ATM e que o mesmo age em partes pela via NO-cGMP, pois ODQ (inibidor da guanilato ciclase) bloqueou o efeito antinociceptivo do estradiol. Na pesquisa de Chaves *et al.* (2011) demonstrou que os inibidores de NO (L-NAME e 1400W) participaram dos mecanismos inflamatórios na disfunção temporomandibular induzidos por zymosan.

Comprovando em partes com nossos resultados, Carvalho; Branco; Passini (2014) demonstra que o efeito antinociceptivo não dependeu da via HO-1, de maneira que nem o ZnPPX (inibidor seletivo de HO-1) e nem o substrato de HO (heme-lisinato) alteraram o índice de analgesia instigado pelo estresse agudo, demonstrando que esse efeito antinociceptivo foi bloqueado pelo pré-tratamento com ODQ (inibidor seletivo de sGC), o que explica o mecanismo de ação depende da via do óxido nítrico (NO).

Recentemente, Rivanor *et al.* (2017) demonstrou a ação antinociceptiva e antiinflamatória de uma lectina a partir de alga verde *cupressoides Caulerpa* (CCL) na hipernociceção inflamatória da ATM, e a mesma independe da via opioide e do NO/cGMP /PKG / K⁺ATP. Alves *et al.* (2018) em seu estudo apresenta. Coura *et al.* (2017) apresenta em seu estudo que *Gracilaria cornea* (fracção polissulfatada a partir da alga vermelha) converteu o comportamento nociceptiva induzida por formalina em modelo de ATM, ainda assim, depende da via do HO-1, da via (NO / cGMP / PKG / K⁺ATP) e dos receptores opioides μ e κ .

No estudo foi demonstrado que o antagonista não-seletivo dos receptores opioides naloxona não reverteu o efeito antinociceptivo do MC-D7 e MC-D9, mostrando que os mecanismos envolvidos não agem centralmente. Diferente do nosso resultado, Silveira (2017) apresenta uma correlação entre a ativação dos receptores opioides centrais (naloxona) e o efeito antinociceptivo do MC-H, um outro composto semissintético obtido a partir do benzilisotiocianato MC-1 isolado das flores da *Moringa Oleifera*. No estudo de Fávaro-Moreira (2009) foi demonstrado que receptor opioide naloxona não bloqueou o efeito antinociceptivo do estradiol em ATM. Alves *et al.* (2018) apresenta em seus resultados o efeito antinociceptivo de uma lectina a partir de *Abelmoschus Esculentus* na hipernociceção na ATM de ratos, além de depender em partes da via opioide, pois o efeito antinociceptivo da ATM foi mediado pelos receptores δ e κ .

Araújo *et al.* (2017) apresenta que *Solieria fi liformis* (polissacárido sulfatado a partir da alga vermelha) é eficaz no efeito antinociceptivo no modelo de ATM e depende da via opioide.

Outro estudo, Miranda *et al.* (2014) apresenta em seus resultados que a gabapentina demonstra efeito antinociceptivo na dor orofacial e age em partes pela via opioide, pois a naltrexona bloqueou o efeito antinociceptivo da gabapentina e também age em parte pela via óxido nítrico NO/cGMP. O estudo de Espinoza *et al.* (2016) demonstrou o efeito antinociceptivo do tapentadol-cetoralac em teste de formalina em ATM e o mecanismo de ação age pela via opioide e sensíveis a canais de K^+_{ATP} , uma vez que naloxona e glibenclamida reverteram o efeito antinociceptivo da combinação tapentadolcetoralac. No estudo de Zhang *et al.* (2018) foi demonstrado que administração central do DN-9 (opioide misto) produziu efeito antinociceptivo em modelos de dor orofacial mediados pelos receptores opioides κ e μ . Tamaddonfard; Erfanparast; Khalilzadeh (2012) em seu estudo relata que a pilocarpina apresentou efeito antinociceptivo em dor orofacial induzida por formalina, o que parece estar incluído nessa antinocicepção os opioides analgésico não endógeno.

8 CONCLUSÃO

Concluimos que o MC-D7 e MC-D9 compostos semissintéticos derivados do benzilisotiocianato MC-1 isolado das flores de *Moringa oleifera* apresentaram atividade antinociceptiva e anti-inflamatória no modelo de hipernocicepção inflamatória na ATM de ratos induzida por formalina. Os mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo de MCD7 ocorrem periféricamente pela via HO-1/GMPc, e que MC-D9 age também periféricamente pela via óxido nítrico NO/GMPc/K⁺_{ATP}.

REFERENCIAS

ABBOTT, F. V., FRANKLIN, K. B. J., CONNELL, B. The stress of a novel environment reduces formalin pain: possible role of serotonin. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v.126, n.1-2, p.141-144, 1986.

AHMED, N; PETERSSON, A; CATARINA, A.I; MUSTAFA, H; ALSTERGREN, P. Tumor necrosis factor mediates temporomandibular joint bone tissue resorption in rheumatoid arthritis. *Acta Odontol Scand.* 2015;73(3):232-40.

ALEIXO, G.A.S et al. Tratamento da dor em pequenos animais: classificação, indicações e vias de administração dos analgésicos (revisão de literatura: parte II). *Medicina Veterinária (UFRPE)*, Recife, v.11, n.1 (jan-mar), p.29-40, 2017

ALMEIDA, F.F; COSTA JUNIOR, A.L; DOCA, F.N.P; TURRA, V. **Experiência de Dor e Variáveis Psicossociais: o Estado da Arte no Brasil.** *Temas em Psicologia* - 2010, Vol. 18, no 2, 367 – 376.

ALHKMANI, F; KUMAR, S; KHAN S.A. Estimation of total phenolic content, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of *Moringa Oleifera*. *Asian Pac J Trop Biomed* 2013; 3(8): 623-627.

ALSTERGREN, P.; BENAVENTE, C.; KOOP, S. Interleukin 1 β , Interleukin 1 receptor antagonist, and Interleukin 1 soluble receptor II in temporomandibular joint synovial fluid from patients with chronic polyarthritides. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 61, n. 10, p. 1171-1178, 2003.

ALVES, S.M et al. The efficacy of a lectin from *Abelmoschus Esculentus* depends on central opioid receptor activation to reduce temporomandibular joint hypernociception in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 101 (2018) 478-484.

ARAUJO, I.W.F et al. Role of central opioid on the antinociceptive effect of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Solieria filiformis* in induced temporomandibular joint pain. **International Immunopharmacology** 44 (2017) 160–167.

ARENDDT-NIELSEN, L. *Pain Control.* v. 227, p. 285–301, 2015.

ANWAR et al. *Moringa oleifera* a food plant with multiple medicinal uses. **Phytother. Res. PTR** 2007; 21; 17-25.

BAKRE, A. G.; ADERIBIGBE, A. O.; ADEMOWO, O. G. Studies on neuropharmacological profile of ethanol extract of *Moringa oleifera* leaves in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 149, n. 3, p. 783–9, 2013.

BERG, K. A. et al. Regulation of μ -Opioid Receptor Signaling in Peripheral Sensory Neurons In Vitro and In Vivo. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 338, n. 1, p. 92–99, 1 jul. 2011.

BIJEM, K.R.V; PADI, S.S.V; LAL SHARMA, P., 2013. Pharmacological activation of heme oxygenase (HO)-1/carbon monoxide pathway prevents the development of peripheral neuropathic pain in Wistar rats. Naunyn. **Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.** 386, 79–90. doi:10.1007/s00210-012-0816-1.

BOCCHI, E.A; KUHN, A.M.B; NASCIMENTO, R.S.G.F. Características psicológicas de pacientes com queixa de disfunção da articulação temporomandibular. **Psikhe** 2000; 5(1):70-6

BÖRNER, C.; HÖLLT, V.; KRAUS, J. Involvement of activator protein-1 in transcriptional regulation of the human μ -opioid receptor gene. **Molecular pharmacology**, v. 61, n. 4, p. 800–5, 2002.

BRANCO, C.A et al. Acupuntura como tratamento complementar nas disfunções temporomandibulares: revisão da literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**. 2005; 34 (1): 11-6

BRINES, R. Myeloid Heme Oxygenase-1 Regulates the Acute Inflammatory Response to Zymosan in the Mouse Air Pouch. *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2018, Doi.org/10.1155/2018/5053091.

BUSSEROLLES, J; MEGIAS, M. C. TERCENCIA, and ALCARAZ, M. J. “Heme oxygenase-1 inhibits apoptosis in Caco-2 cells via activation of Akt pathway,” **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, vol. 38, no. 9, pp. 1510–1517, 2006.

CAIRNS, B. et al. JOR-CORE recommendations on rehabilitation of temporomandibular disorders. **Journal of oral rehabilitation**, v. 37, n. 6, p. 481–9, 11 maio 2010.

CARRARA, S.V; CONTI, P.C; BARBOSA, J.S (2010). Termo do 1º consenso em Disfunção Temporomandibular e Dor Orofacial. **Dental Press J Orthod**, 15 (3), pp.114120.

CARVALHO, P.G.; BRANCO, L.G.S.; LEITE- PANISSI, C.R.A. Involvement of the heme oxygenase–carbon monoxide–cGMP pathway in the nociception induced by acute painful stimulus in rats. **Brain Res.**, v. 1385, p. 107 – 113, 2011.

CASTANY, S. The Induction of Heme Oxygenase 1 decreases Painful Diabetic Neuropathy and Enhances the Antinociceptive Effects of Morphine in Diabetic Mice. PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0146427 January 5, 2016.

CHAVES, H. V. et al. Experimental Model of Zymosan-Induced Arthritis in the Rat Temporomandibular Joint: Role of Nitric Oxide and Neutrophils. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1–11, 2011.

CHAVES, H. V. et al. Heme oxygenase-1/biliverdin/carbon monoxide pathway downregulates hypernociception in rats by a mechanism dependent on cGMP/ATP-sensitive K⁺ channels. **Inflammation Research**, v. 67, n. 5, p. 407–422, 2018.

CLÉRIGUES, V.; GUILLÉN, M.I.; GOMAR, F.; ALCARAZ, M.J. Haem oxygenase-1 counteracts the effects of interleukin-1 β on inflammatory and senescence markers in cartilage-subchondral bone explants from osteoarthritic patients. **Clin Sci.**, v.122, n. 5, p. 239-50, 2012b.

CONTI, P.C.R et al. Orofacial pain and temporomandibular disorders: the impact on oral health and quality of life. **Brazilian Oral Research**, v. 26, n.1 p.120-123, 2012.

COURA, C.O et al., 2017. Mechanisms involved in antinociception induced by a polysulfated fraction from seaweed *Gracilaria cornea* in the temporomandibular joint of rats. **Int. J. Biol. Macromol.** 97, 76–84. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.01.017.

CONTASSOLT, E; BEER, H.D; FRENCH, L.E. Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin. *Swiss Med Wkly.* 2012;142: w13590.

- CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 5, p. 1755–1760, 2005.
- CUNHA, T. M. et al. TNF-alpha and IL-1beta mediate inflammatory hypernociception in mice triggered by B1 but not B2 kinin receptor. **European journal of pharmacology**, v. 573, n. 1–3, p. 221–9, 2007.
- DAMASCENO, F.M; BARBIERI, L.G. **O tratamento Fisioterapêutico nas Disfunções da Articulação Temporomandibular: Uma Revisão Integrativa.** Formar Interdisciplinar. Sobral, ano 3, V.1, p. 03-15, jul-dez 2014.
- DAVID, M.J; MORGON, N.H; TORRESI, S.I.C **Química Nova**, v.40, n°10, p.1186-1190, 2017
- DE SIQUEIRA, S. R. D. T.; VILELA, T. T.; FLORINDO, A. A. Prevalence of headache and orofacial pain in adults and elders in a Brazilian community: An epidemiological study. **Gerodontology**, v. 32, n. 2, p. 123–131, 2015.
- DOURADO, M. (2007). Fisiopatologia da Dor. *In*: Pinto, A. (Ed.). *Fisiopatologia: Fundamentos e aplicações*. Lisboa, Lidel edições, pp. 261-279.
- DO VAL, D.R et al., 2014. Tephrosia toxicaria Pers. reduces temporomandibular joint inflammatory hypernociception: The involvement of the HO-1 pathway. *Eur. J. Pain* (United Kingdom) 18, 1280–1289. doi:10.1002/j.1532-2149.2014.488.x.
- FAVARO-MOREIRA et al., PERIPHERAL ESTRADIOL INDUCES TEMPOROMANDIBULAR JOINT ANTINOCICEPTION IN RATS BY ACTIVATING THE NITRIC OXIDE/CYCLIC GUANOSINE MONOPHOSPHATE SIGNALING PATHWAY. *Neuroscience* 164 (2009) 724–732.
- FERNANDES, A.U.R. et al. **Desordem temporomandibular e ansiedade em graduandos de odontologia.** *Cienc. Odontol. Bras*, 2007; 10 (1): 70-77.
- FERREIRA, K.D.M et al. Fatores psicológicos relacionada a sintomatologia crônica das desordens temporomandibulares- revisão de literatura. **RFO UPF**, v.14, n.3, p.262-267, 2009.
- FINE, M. Quantifying the impact of NSAID-associated adverse events. **The American journal of managed care**, v. 19, n. 14 Suppl, p. s267-72, nov. 2013.

FLORENTINO, I.J et al. Involvement of the NO/cGMP/KATP pathway in the antinociceptive effect of the new pyrazole 5-(1-(3-fluorophenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-2*H*tetrazole (LQFM-021). **Nitric Oxide** 47 (2015) 17–24.

FMUL. CEMBE da FMUL - NOC da Dor Neuropática Localizada. DOR. 2011;19:6–48.

FREDRIKSSON, L.; ALSTERGREN, P.; KOPP, S. Serotonergic mechanisms influence the response to glucocorticoid treatment in TMJ arthritis. **Mediators Inflamm.**, v. 2005, n. 4, p. 194-201, 2005.

FREIRE, A. B. et al. Multimodal physiotherapeutic approach: effects on the temporomandibular disorder diagnosis and severity. **Fisioterapia e Movimento**, Curitiba, v.27, n.2, p.219-227, 2014.

FREITAS, R.S et al., 2016. Lectin from *Abelmoschus esculentus* reduces zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats via heme oxygenase-1 pathway integrity and tnf- α and il-1 β suppression. **International Immunopharmacology** 38 (2016) 313–323.

GARCIA-ARNANDIS, M. I; GUILLEN, M. A. CASTEJON, F; GOMAR, and M. J. ALCARÁZ “Haem oxygenase-1 down-regulates high mobility group box 1 and matrix metalloproteinases in osteoarthritic synoviocytes,” **Rheumatology**, vol. 49, no. 5, pp. 854–861, 2010.

GARCIA. C.V et al. The nuclear factor-erythroid 2-related factor/heme oxygenase-1 axis is critical for the inflammatory features of type 2 diabetes-associated osteoarthritis. **Journal of biological chemistry**.v.292 (35), 2017.

GONÇALVES, D.A.G. et al. Symptoms of temporomandibular disorder: an epidemiological study. **Journal of Orofacial Pain** , v.24, n.3, p.270-8, 2010.

GREENE, C.S. Managing patients with temporomandibular disorders: A new “standard of care” American **Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics** July 2010.

GROCHOT-PRZECZEK, A; DULAR, J; JOZKOWICZ, A, Haem oxygenase-1: noncanonical roles in physiology and pathology. **Clinical Science** (2012) **122**, 93–103.

- GYEKE, I.J.A et al. Micro- and Macroelemental Composition and Safety Evaluation of the Nutraceutical *Moringa oleifera* Leaves. **Journal of Toxicology**. v. 2014, Article ID 786979, 13 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/786979>
- HARGREAVES, K.M. Review - Orofacial pain. **Pain**. v.152, p.S25-S32, 2011
- KANEYAMA, K.; SEGAMI, N.; NISHIMURA, M.; SUZUKI, T.; SATO, J. Importance of proinflammatory cytokines in synovial fluid from 121 joints with temporomandibular disorders. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 40, n. 5, p. 418-423, 2002.
- KONRAD, F.M. Tissue heme oxygenase-1 exerts anti-inflammatory effects on LPS-induced pulmonary inflammation. **Mucosal Immunology**, doi:10.1038/mi.2015.39 / 2015.
- KOSTRZEWA-JANICKA, J; JURKOWSKI, P; NEDZI-GÓRA, M., 2012. Inflammatory markers in temporomandibular joint disorders 37, 290–293. doi:10.5114/ceji.2012.30809.
- KRAUS, J. et al. Regulation of μ -Opioid Receptor Gene Transcription by Interleukin-4 and Influence of an Allelic Variation within a STAT6 Transcription Factor Binding Site. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 47, p. 43901–43908, 23 nov. 2001.
- KUROIWA, D.N et al. Desordens temporomandibulares e dor orofacial: estudo da qualidade de vida medida pelo Medical Outcomes Study 36 – Item Short Form Health Survey. **Rev Dor**. São Paulo, 2011 abr-jun;12(2):93-8
- LAMANAA, S. M. S. *et al.* The anti-inflammatory effect of tramadol in the temporomandibular joint of rats. **Eur. J. of Phar.**, v. 807, p.82–90, 2017
- LEE, K. S. et al. Androgen receptor transcriptionally regulates μ -opioid receptor expression in rat trigeminal ganglia. **Neuroscience**, v. 331, p. 52–61, set. 2016.
- MACEDO, C. G. *et al.* Coactivation of μ - and κ -Opioid Receptors May Mediate the Protective Effect of Testosterone on the Development of Temporomandibular Joint Nociception in Male Rats. **J Oral Facial Pain Headache**, v.30(1), p.61-67, 2016
- MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, C. L. et al. *Moringa Oleifera*, a species with potential analgesic and anti-inflammatory activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 482–488, 2017.
- MATTHEWS, B.; SESSLE, B.J. Mecanismos periféricos da dor orofacial. In: Dor orofacial. Da ciência Básica à Conduta Clínica. 1ª ed. **Quintessence**. p. 37-46, 2005.

- MARVIZON, J.C; MA, Y.Y; CHARLES, A.C; WALDWN, W; EVANS, C.J (2010) Pharmacology of the Opioid System. In: Pharmacology of Pain (Beaulieu P, Lussier D, Porreca F, Dickenson A, ed), pp87-110. Seattle: IASP Press.
- McKUNE, M. C.; MURRELL, J. C.; NOLAN, A. M.; WHITE, K. L.; WRIGHT, B. D. Nociception and pain. In: GRIMM, K. A.; LAMONT, L. A.; TRANQUILLI, W. J. GREENE, S.A.; ROBERTSON, S. A. **Veterinary anesthesia and analgesia - The fifth edition of Lumb and Jones**. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2015. p. 584-616.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/definicao.htm>. Acessado em 2011
- MIRANDA, J. et al, 2015. EFFECT OF PAIN CHRONIFICATION AND CHRONIC PAIN ON AN ENDOGENOUS PAIN MODULATION CIRCUIT IN RATS. **Neuroscience** 286 (2015) p. 37–44.
- MISHRA, G. et al. Traditional uses phytochemistry and pharmacological properties of *Moringa oleifera* plant: An overview. **Der Pharmacia Lettre**, v. 3, n. 2, p. 141–164, 2011.
- MOFFAT, R. e RAE, C. (2010). Anatomy, physiology and pharmacology of pain. *Anesthesia and Intensive Care Medicine*, 12(1), pp.12-15.
- NASCIMENTO, L.A; KRELING, M.C.G.D. Avaliação da dor como 5 sinal vital: opinião dos profissionais de enfermagem. *Acta. Paul. Enferm.* V.24, n.1, p50-54, 2011.
- NISHIYAMA, A. et al. Influence of Psychosocial Factors and Habitual Behavior in Temporomandibular Disorder-Related Symptoms in a Working Population in Japan. **The Open Dendistry Journal**, v.6, p. 240-247, 2012.
- NUNES J.R, P.C., MACIEL, R.L.R., BABINSKI, D.S.C. **Propriedades anatômicas e funcionais da ATM com aplicabilidade no tratamento fisioterapêutico**. Fisioterapia Brasil. V 6. N 5. Set/Out, 2005.
- OKESON, J. P. Dores Bucofaciais de Bell. 5. ed. São Paulo: **Quintess.**, 2003
- OLIVEIRA, W. Disfunções Temporomandibulares. São Paulo: Artes Médicas; 2002.

OLIVEIRA-FUSARO, M.C.G., et al., 2012. 5-HT induces temporomandibular joint nociception in rats through the local release of inflammatory mediators and activation of local B adrenoceptors. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 102, 458–464. doi:10.1016/j.pbb.2012.06.005

OROZCO, L. D; KAPTURCZAK, M. H; BARAJAS, B. et al., “Heme oxygenase-1 expression in macrophages plays a beneficial role in atherosclerosis,” **Circulation Research**, vol. 100, no. 12, pp. 1703–1711, 2007

PARENTE, A.C. MECANISMOS PERIFÉRICOS E CENTRAIS DOS EFEITOS ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIOS DE DOIS COMPOSTOS SEMISSINTÉTICOS MC-D7 E MC-D9 OBTIDOS A PARTIR DE FLORES DA *MORINGA OLEIFERA* NA ATM DE RATOS [tese de mestrado], 2017.

PARK, E. J. et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression and inducible nitric oxide synthase By 4-[(2'-Oacetyl- α Lrhamnosyloxy)benzyl]isothiocyanate from *Moringa oleífera*. **Nutr. Cancer.** v.63, n.6, p.971-982, 2011.

PINTO, L. G. et al. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. **Pain**, v. 148, n. 2, p. 247–256, 2010.

POSS, K. D.; TONEGAWA, S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1- deficient cells **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** (94): 10925-10930, 1997.

RAMOS, A.C.A et al. Articulação Temporomandibular-Aspectos Normais e **Deslocamento de Disco: Imagem Por Ressonância Magnética**. **Radiol Bras** 2004; 37 (6): 449-454.

RIEDEL; W.; NEECK, G. Nociception, Pain, and Antinociception: Current concepts. **Z. Rheumatol.**, V.60, n.6, p.404-15, 2001.

RIZZOLO, R.; MADEIRA, M. Anatomia Facial com fundamentos de anatomia sistêmica geral. São Paulo: Sarvier; 2006.

ROSLAND, J.H., 1991. The formalin test in mice : the influence of ambient temperature 45, 211–216.

ROSSI, M. A; THIERRY, S; DELBAUVE et al., “Specific expression of heme oxygenase-1 by myeloid cells modulates renal ischemia-reperfusion injury,” **Science Reports**, vol. 7, no. 1, p. 197, 2017.

ROVERONI, R.C et al, 2001. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: The TMJ formalin test. **Pain** 94, 185–191. doi:10.1016/S0304-3959(01)00357-8.

SACHS, D.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 101, n. 10, p. 3680-3685, 2004.

SANDWELL, S. E. et al. Trigeminal nucleus caudalis anatomy: Guidance for radiofrequency dorsal root entry zone lesioning. **Stereotactic and Functional Neurosurgery**, v. 88, n. 5, p. 269–276, 2010.

SANTOS, J. M.; CAVACAS, A.; SILVA, A. ZAGALA, C.; EVANGELISTA, J.; OLIVEIRA, P. et al. (2009). Anatomia Geral, Moreno (5^a ed.). Publicações Egas Moniz.

SANTOS, W.J; GIACOMIN, K.C; FIRMO, J.O.A. **Alteridade da dor nas práticas de Saúde Coletiva: implicações para a atenção à saúde de pessoas idosas**. *Ciência & Saúde Coletiva*, 20(12):3713-3721, 2015.

SCARPELLI, P.B. Análise do Comportamento de Dor em Disfunção Temporomandibular. Dissertação de Mestrado. PUC- campinas, 2007.

SESSLE, B.J. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. **Crit Rev Oral Biol Med.**, v.11, p.57-91, 2000.

SESSLE, B. J. Mecanismos de dor orofacial no tronco cerebral. In: FRICTON, J. R. e DUBNER, R. Dor orofacial e desordens temporomandibulares, São Paulo: Editora Santos, 2003. P. 43-60

SESSLE, B.J. Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. **Minerva Anesthesiol.** 71, 117–36, 2005.

SESSLE, B. J. **Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain**. [s.l.] Elsevier Inc., 2011. v. 97.

SILVA, J. C. et al. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmacy**, v. 94, p. 18-23, 2013

SILVEIRA, F.D. Receptores Opioides e Enzima Hemeoxigenase-1 Medeiam Antinocicepção de um Derivado Semissintético (MC-H) obtido a partir de um Isotiocianato Isolado das Flores da *Moringa Oleifera* em Modelo de Dor na ATM de Ratos [tese de mestrado], 2017.

SHEN, Y; ZHANG, Z.J; ZHU, M.D; JIANG, B.C; YANG, T; GAO, Y.J. Exogenous induction of HO-1 alleviates vincristine-induced neuropathic pain by reducing spinal glial activation in mice. *Neurobiol Dis.* 2015; 79:100– 10. doi: 10.1016/j.nbd.2015.04.012 PMID: 25956228

SLADE, G.D. Cytokine biomarkers and chronic pain: Association of genes, transcription, and circulating proteins with temporomandibular disorders and widespread palpation tenderness. **PAIN** 152 (2011) 2802–2812.

STOHS, S. J.; HARTMAN, M. J. Review of the Safety and Efficacy of *Moringa Oleifera*. **Phytotherapy research: PTR**, v. 29, n. 6, p. 796–804, 1 jun. 2015.

SORENSEN, A; HRESKO, K; BUTCHEUR, S; PIERCE, S; TRAMONTINA, V; LEONARDI, R. et al. Expression of Interleukin-1 and temporomandibular disorder: contemporary review of the literature. *Cranio.* 2017;19:1-5. [Epub ahead of print].

TAN, W. S. et al. *Moringa oleifera* Flower Extract Suppresses the Activation of Inflammatory Mediators in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophages via NF-κB Pathway. **Mediators of inflammation**, v. 2015, p. 720171, 2015.

TAMADDONFARD, E; ERFANPARAST, A; KHALILZADEH, E. Effect of pilocarpine on the formalin-induced orofacial pain in rats. **Veterinary Research Forum.** 2012; 3 (2) 91 – 95.

TEIXEIRA, M.J. Fisiopatologia da nocicepção e da supressão da dor. **JBA**, v.1, n.4, p.329334, 2001.

- TIPTON, D.A; CHRISTIAN, J; BLUMER, A., 2016. Effects of cranberry components on IL-1 β -stimulated production of. Arch. **Oral Biol.** 68, 88–96 doi:10.1016/j.archoralbio.2016.04.005.
- TJAKKES, G.H.E et al. TMD pain: the effect on health related quality of life and the influence of pain duration. **Health and Quality of Life Outcomes**, v.8, n.46, p. 1-8, 2010.
- TJOLSEN, A. *et al.* The formalin test: an evaluation of the method. **Pain.**, v. 51(1), p. 5-17, 1992
- TORRES, F. et. al. **Efeitos dos tratamentos fisioterapêutico e odontológico em pacientes com disfunção temporomandibular.** Fisioter Mov., v. 25, n.1, p.117-125, 2012.
- TRAKSHEL, G.M.; KUTTY, R.K.; MAINES, M.D. Purification and characterization of the major constitutive form of testicular heme oxygenase. The noninducible isoform. **J. Biol. Chem** (261): 11131-7, 1986.
- VERMA, A. R; VIJAYKUMAR, M; MATHELA, C.S, Rao CV. In-vitro and in-vivo antioxidant properties of different fractions of *Moringa Oleifera* leaves. Food Chem Toxicol 2009; 47: 2196-2201.
- WAITE, P. M. E. Trigeminal sensory system. In: PAXINOS, G. The rats nervous system. 3^a Ed. Amsterdam: **Elsevier**, 2004. p. 817-851.
- WIECKIEWICZ, M. et al. Reported concepts for the treatment modalities and pain management of temporomandibular disorders. **The Journal of Headache and Pain**, v. 16, n. 1, p. 106, 7 dez. 2015.
- WUNDER, C.; POTTER, R. F. The Heme Oxygenase System: Its Role in Liver Inflammation. Current Drug Targets - **Cardiovascular & Haematological Disorders.** v. 3, p. 199-208, 2003
- ZHANG, Y et al. Inhibition of morphine tolerance by MrgC receptor via modulation of interleukin- β and matrix metalloproteinase 9 in dorsal root ganglia in rats. **European Journal Of Pharmacology.** China, p. 10-17. nov. 2017.
- YI, Z. et al. Optimization of formulation and processing of *Moringa oleifera* and spirulina complex tablets. **Saudi Journal of Biological Sciences** (2017) 24, 122–126.

ZAKRZEWSKA, J. M. Multi-dimensionality of chronic pain of the oral cavity and face.
The journal of headache and pain, v. 14, p. 37, 2013.